

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**

**Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas**



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

**DETERMINACIÓN SEXUAL Y  
DIFERENCIACIÓN GONADAL EN YACARÉ  
OVERO. GENES INVOLUCRADOS EN SU  
REGULACIÓN Y EFECTO DE LA  
EXPOSICIÓN A PERTURBADORES  
ENDOCRINOS.**

**Lic. Guillermina Canesini**

Director de Tesis: Dr. Jorge Guillermo Ramos

Co-director de Tesis: Dra. Mónica Muñoz-de-Toro

Instituto de Salud y Ambiente del Litoral - Facultad de  
Bioquímica y Ciencias Biológicas - Universidad Nacional del  
Litoral.

**-2017-**

## Agradecimientos:

*“La utopía está en el horizonte. Me acerco dos pasos, ella se aleja dos pasos. Camino diez pasos y el horizonte se desplaza diez pasos más allá...*

*Entonces, ¿Para qué sirve la utopía?*

*Sirve para eso... para caminar.”*

*Fernando Birri*

*A aquellos que transitaron conmigo y consciente o inconscientemente,  
hicieron más bello el camino hacia esta utopía...*

*A la **Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas** de la **Universidad Nacional del Litoral**, por permitirme el desarrollo y crecimiento como profesional y como persona, no sólo a lo largo del Doctorado sino también en mi carrera de grado.*

*A la **ANPCyT** y al **CONICET**, por haberme otorgado la beca inicial de postgrado y la beca de finalización de doctorado, respectivamente. Las cuales me permitieron realizar mi doctorado y desarrollarme profesionalmente.*

*Al **Dr. Enrique Luque**, director del Instituto de Salud y Ambiente del Litoral, por brindarme este gran espacio de trabajo, y poner a disposición los recursos e insumos necesarios para alcanzar los objetivos de esta Tesis.*

*A mi Director, el **Dr. Guillermo Ramos**, por la valentía y generosidad a la hora de asumir este compromiso; por la contención y el apoyo constante; por su grandeza y paciencia al formarme; por la motivación y por darme la confianza necesaria, cuando las fuerzas decaían. Y sobre todo por su invaluable tiempo, que tanto he consumido.*

*A mi Co-Directora, la **Dra. Mónica Muñoz-de-Toro**, a ella le debo mis inicios, tanto en Ciencia, como en Docencia, gracias por valorar mi esfuerzo, pero sobre todo por confiar en mí desde el comienzo.*

*A la **Dra. Milena Durando**, por acompañarme y formarme meticulosamente, durante los primeros años de carrera.*

*A la **Dra. Cora Stoker**, por su generosidad, su paciencia y esfuerzo, porque en este último tiempo se convirtió en un pilar fundamental para mi desarrollo profesional.*

*A mis compañeros del **ISAL** y de la **Cátedra de Patología Humana**, donde aprendí muchísimo de todos los que generosamente me enseñaron una técnica o a usar un equipo. También, donde cultivé muchos afectos, compartí momentos imborrables, infinidad de mates y hasta me hice de **Buenos Amigos!***

*A mis **padres**, a ellos les debo la vida y los valores con los cuales me educaron, donde siempre se premió el esfuerzo, porque nada se consigue sin él. Porque me dieron la libertad de tomar todas las decisiones por las cuales hoy soy yo, y los límites fueron*

*constituidos por los mismos valores inculcados. Gracias infinitas por incentivar me a perseguir mis sueños, sin ataduras!*

*A mis **hermanas**, mis cuasi-mamás, mis amigas... Las que aguantaron los peores “berrinches”, las que me vieron tropezar, caer, levantarme y seguir, y siempre estuvieron ahí para sostenerme la mano. Gracias además, por el regalo de hacerme Tía y Madrina!!!*

*A mis **amigos de siempre**! Los de la niñez, los de la adolescencia, los de “la facu”, que sin entender que tanto hacía, estuvieron ahí, brindando su apoyo.*

*A aquellas personas que me crucé en otros ámbitos, como en las **clases de inglés** o en el club, como **mis compañeros de Hockey Subacuático**. Sin demasiada conciencia me dieron un lugar para crecer y me alentaron a ser mejor siempre, reconociendo mi esfuerzo y denotando mi capacidad por superarme. Eso sin duda, también se tradujo en un mejor rendimiento profesional.*

*A **Juan**... que durante estos años de carrera compartió este camino conmigo, me incentivó siempre a crecer y a superarme. Con la libertad necesaria para tomar mis propias decisiones, me enseñó que cuando uno va despacio, llega lejos... y que amar es permitirle al otro concretar sus sueños.*

*A **ellas**... **Amabile y Clyde**, las dos estrellas que velan por mí eternamente!*

## Publicaciones:

1. **Canesini G**; Stoker C; Galoppo GH; Durando ML; Tschopp MV; Luque EH; Muñoz-de-Toro MM; Ramos JG. (2018). *Temperature vs. estrogen-induced sex determination in Caiman latirostris embryos: both females, but with different expression patterns of key molecules involved in ovarian development*. Gen Comp Endocrinol. 259:176-188.
2. Galoppo GH; **Canesini G**; Tavalieri YE; Stoker C; Kass L; Luque EH; Muñoz-de-Toro M. (2017). *Bisphenol A disrupts the temporal pattern of histofunctional changes in Caiman latirostris female reproductive tract*. Gen Comp Endocrinol. 254:75–85.
3. Andreoli MF.; Stoker C.; Lazzarino GP.; **Canesini G.**; Luque EH.; Ramos JG. (2016). *Dietary whey reduces energy intake and alters hypothalamic gene expression in obese phyto-oestrogen-deprived male rats*. Br J Nutr. 116:1125-33.
4. Galoppo GH; Stoker C; **Canesini G**; Schierano-Marotti G; Durando M; Luque EH; Muñoz-de-Toro M. (2016). *Postnatal development and histo-functional differentiation of the oviduct in the broad-snouted caiman (Caiman latirostris)*. Gen Comp Endocrinol. 236:42-53.
5. Durando M; **Canesini G**; Cocito LL; Galoppo GH; Zayas MA; Luque EH; Muñoz-de-Toro M. (2016). *Histomorphological changes in testes of broad-snouted caimans (Caiman latirostris) associated with in ovo exposure to endocrine-disrupting chemicals*. J Exp Zool A Ecol Genet Physiol. 325:84-96.

# ÍNDICE

|   |           |
|---|-----------|
| <b>RESUMEN .....</b>  | <b>10</b> |
| <b>ABSTRACT.....</b>  | <b>15</b> |
| <b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>  | <b>20</b> |
| 1.1 DETERMINACIÓN SEXUAL Y DIFERENCIACIÓN GONADAL. ....   | 21        |
| 1.1.1 <i>Determinación sexual genética.</i> .....   | 21        |
| 1.1.2 <i>Determinación sexual Cromosómica.</i> .....  | 21        |
| 1.1.3 <i>Determinación sexual Ambiental.</i> .....  | 23        |
| 1.1.4 <i>Evolución de la determinación sexual</i> .....   | 24        |
| 1.1.5 <i>Determinación sexual inducida por estrógenos (DSE<sub>2</sub>).</i> .....  | 25        |
| 1.2 GENES IMPLICADOS EN LA DIFERENCIACIÓN GONADAL.....  | 26        |
| 1.3 ROL DE LA ENZIMA AROMATASA EN LA DETERMINACIÓN SEXUAL Y DIFERENCIACIÓN GONADAL. ....  | 27        |
| 1.4 MECANISMOS DE PROLIFERACIÓN Y MUERTE CELULAR RELACIONADOS CON LA DETERMINACIÓN SEXUAL Y DIFERENCIACIÓN GONADAL. ....                              | 30        |
| 1.5 CAIMAN LATIROSTRIS (YACARÉ OVERO). ....   | 30        |
| 1.5.1 <i>Biología Reproductiva</i> .....  | 31        |
| 1.6 PERTURBACIÓN ENDOCRINA. ....  | 33        |
| 1.7 ESPECIE CENTINELA.....  | 34        |
| 1.7.1 <i>Caiman latirostris como organismo centinela de contaminación ambiental.</i> .....  | 34        |
| 1.8 ATRAZINA.....   | 35        |
| <b>2. HIPÓTESIS .....</b>   | <b>37</b> |
| 2.1 HIPÓTESIS GENERAL: .....  | 38        |
| <b>3. OBJETIVOS.....</b>  | <b>39</b> |
| 3.1. OBJETIVO GENERAL .....   | 40        |
| 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....   | 40        |
| <b>4. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>  | <b>41</b> |
| 4.1 RECOLECCIÓN Y TRASLADO DE LOS HUEVOS .....  | 42        |
| 4.2. DISEÑO EXPERIMENTAL Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS .....  | 42        |
| 4.3 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS: .....  | 43        |
| 4.3.1 <i>Procesado Histológico:</i> .....   | 44        |
| 4.3.2. <i>Extracción de material genético gonadal, separado del complejo GAM mediante la técnica de micropunción de Palkovitz.</i> .....              | 49        |
| 4.4. GENERACIÓN DE UN ANTICUERPO POLICLONAL ANTI-AROMATASA. ....  | 50        |
| 4.4.1. <i>Diseño bioinformático, amplificación, clonado de la secuencia nucleotídica necesaria para la expresión del antígeno de Aromatasa.</i> ..... | 50        |
| 4.4.2. <i>Expresión y purificación del antígeno recombinante.</i> .....   | 53        |
| 4.4.3. <i>Obtención, purificación y caracterización del anticuerpo policlonal monoespecífico de conejo.</i> .....                                     | 53        |
| 4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....   | 54        |
| <b>5. RESULTADOS.....</b>   | <b>56</b> |
| 5.1 CARACTERIZACIÓN DE LA DETERMINACIÓN SEXUAL POR TEMPERATURA (DST).....   | 57        |
| 5.1.1. <i>Obtención de embriones de Caiman latirostris en estadios 22, 24 y 27 de desarrollo.</i> .....   | 57        |

|  |            |
|--|------------|
| 5.1.2. Localización anatómica y cambios histo-morfológicos durante el desarrollo de las gónadas.   | 58         |
| 5.1.3. Expresión de los receptores hormonales.   | 60         |
| 5.1.4. Desarrollo del anticuerpo policlonal para la detección de Aromatasa por IHQ.  | 60         |
| 5.1.5. Expresión de aromatasa.   | 64         |
| 5.1.7. Micropunción y expresión génica.  | 67         |
| 5.2. HEMBRAS: ASPECTOS DE LA DETERMINACIÓN SEXUAL POR TEMPERATURA (DST) Y LA DETERMINACIÓN SEXUAL INDUCIDA POR ESTRÓGENOS (DSE <sub>2</sub> ). | 70         |
| 5.2.1. Obtención de embriones de <i>Caiman latirostris</i> en estadios 22, 24 y 27 de desarrollo.  | 70         |
| 5.2.2. Cambios histo-morfológicos durante el desarrollo de las gónadas.  | 70         |
| 5.2.3. Expresión de los receptores hormonales.   | 72         |
| 5.2.4. Expresión de aromatasa.   | 72         |
| 5.2.5. Actividad proliferativa, daño al ADN y apoptosis.   | 75         |
| 5.2.6. Micropunción y expresión génica.  | 78         |
| 5.3. MACHOS: EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN IN OVO A ATRAZINA SOBRE LA DETERMINACIÓN SEXUAL DE CAIMAN LATIROSTRIS.                                   | 80         |
| 5.3.1. Obtención de embriones de <i>Caiman latirostris</i> en estadios 22, 24 y 27 de desarrollo.  | 80         |
| 5.3.2. Cambios histo-morfológicos durante el desarrollo de las gónadas.  | 80         |
| 5.3.3. Expresión de los receptores hormonales.   | 81         |
| 5.3.4. Expresión de aromatasa.   | 82         |
| 5.3.5. Actividad proliferativa y daño en el ADN.   | 82         |
| 5.3.6. Micropunción y expresión génica.  | 86         |
| <b>6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES.</b>  | <b>88</b>  |
| 6.1. CARACTERIZACIÓN DE LA DETERMINACIÓN SEXUAL POR TEMPERATURA (DST).   | 89         |
| 6.2. HEMBRAS: ASPECTOS DE LA DETERMINACIÓN SEXUAL POR TEMPERATURA (DST) Y LA DETERMINACIÓN SEXUAL INDUCIDA POR ESTRÓGENOS (DSE <sub>2</sub> ). | 93         |
| 6.3. MACHOS: EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN IN OVO A ATRAZINA SOBRE LA DETERMINACIÓN SEXUAL DE CAIMAN LATIROSTRIS.                                   | 97         |
| <b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>   | <b>101</b> |

# ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

µg: Microgramo

µm: Micrómetro

*A. missisipiensis*: *Aligator missisipiensis*

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AMH: Hormona Anti-mülleriana

*Amh*: gen que codifica para la hormona Anti-mülleriana

ARNm: Ácido ribonucleico- mensajero

AROM: Enzima citocromo P450 - Aromatasa

ATP: adenosín-trifosfato

ATZ: Atrazina

*C. latirostris*: *Caiman latirostris*

CITES: Convención Internacional sobre el Comercio de Especies Amenazadas de Fauna y Flora

*Cyp19a1*: gen que codifica para la enzima aromatasa

DAB: Diaminobenzidina

DHT: Dihidrotestosterona

*dmrt1*: gen que codifica para el Doublesex and mab-3 related transcription factor 1

DSE<sub>2</sub>: Determinación sexual inducida por estrógenos

DSG: Determinación sexual genética

DST: Determinación sexual por temperatura

E<sub>2</sub>: 17β-estradiol

ER: Receptor de estrógenos

ERα: Receptor de estrógenos alpha

ERβ: Receptor de estrógenos beta

EPA: Agencia para la Protección Ambiental

GAM: Gónada- adrenal y mesonefros

GST: Glutation- S-Transferasa



HMG: High-Mobility Group, grupo de proteínas cromosomales.

IHQ: Immunohistoquímica

IOD: Densidad óptica integrada

KDa: Kilodaltons

L8: Proteína ribosomal L8

*L8*: gen que codifica para la proteína ribosomal L8

PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida

PBS: Solución buffer de fosfatos

PCNA: Antígeno nuclear de proliferación celular

PEs: Perturbadores endocrinos

PR: Receptor de progesterona

PTS: Período termosensible

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa

SD: Desvío estándar

SDS: Dodecilsulfato sódico

SEM: Error estándar de la media

SENASA: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria

*Sf-1*: gen que codifica para el factor esteroideogénico 1.

*Sox-9*: gen que codifica para el SRY-Box 9.

*SRY*: gen que codifica para la proteína Sex determining Region Y

T: Testosterona

TAp63: Isoforma TA del gen supresor de tumores p63

TPH: Temperatura productora de hembras

TPM: Temperatura productora de machos

TUNEL: Marcado de final de corte de dUTP de la deoxinucleotidil transferasa terminal.

VASA: Helicasa de ARN - ATP-dependiente

*wt1*: gen que codifica para la proteína del tumor de Wilms

## **RESUMEN**

El conocimiento sobre las bases moleculares y fisiológicas que determinan el sexo en los reptiles es aún incompleto. La determinación sexual es el proceso que guía a las gónadas bipotenciales (indiferenciadas) a desarrollarse en testículos u ovarios. Puede iniciarse mediante la activación de un gen específico (en especies con determinación sexual genética -pura- DSG) o la influencia del ambiente (en especies con determinación sexual termo-dependiente -DST-por ejemplo) o puede tener elementos de ambos. La diferenciación gonadal se refiere al desarrollo de órganos sexuales especializados (testículos u ovarios).

El sexo de las crías de todas las especies de cocodrilidos y muchas especies de tortugas está determinado por el medio ambiente. La temperatura de incubación de los huevos durante un período crítico de desarrollo (período termosensible-PTS-) es el principal factor que determina el sexo en ausencia de cromosomas sexuales.

A su vez, en los vertebrados en general, los estrógenos son esenciales para el desarrollo ovárico. Los estrógenos pueden anular la temperatura e inducir la diferenciación ovárica incluso a temperaturas de masculinización. La administración de  $17\beta$ -estradiol durante el PTS anula los efectos de la temperatura productora de machos, produciendo hembras fenotípicas en *Trachemys scripta*, tortuga de orejas rojas, (Thunberg in Schoepff, 1792) y *Alligator mississippiensis*, aligátor americano, (Daudin, 1802), entre otros. Este efecto se ha definido como determinación del sexo inducida por estrógenos (DSE<sub>2</sub>).

*Caiman latirostris*, yacaré overo (Daudin, 1802), es una de las dos especies de cocodrilidos que habitan en Argentina. Es un reptil con DST; como ya se ha mencionado, huevos incubados a 30-31°C produce el 100% de crías hembras, y la incubación a 33-34 ° C produce solo machos. Quedan definidas así la temperatura productora de hembras (TPH: 30°C) y la de machos (TPM: 33°C).

En general, se acepta que la temperatura inicia una cascada de eventos moleculares que favorecen el desarrollo de un sexo u otro, alterando el control de la expresión génica y la señalización celular de hormonas esteroides, receptores hormonales y enzimas esteroidogénicas. Numerosos genes termo-sensibles están implicados en la diferenciación gonadal en especies con DST: *amh*, *sox-9*, *sf-1* y el gen que codifica para aromatasa (*cyp19-a1*), entre otros. En algunas especies de tortugas con DST, la actividad de la aromatasa es más alta en gónadas provenientes de huevos incubados a TPH. A sí mismo, los estrógenos son capaces de modificar la expresión de diferentes genes como ya se ha visto en peces, tortugas y cocodrilidos, entre ellos, nuestro grupo de trabajo ha demostrado que la expresión de *sox-9* se ve alterada en hembras de *C. latirostris*, en etapa postnatal, cuya determinación sexual fue inducida por estrógenos.

Se conoce, que numerosos contaminantes presentes en el ambiente, comúnmente denominados químicos perturbadores endocrinos (PEs), poseen la potencialidad de alterar la homeostasis del

sistema endocrino afectando la salud, la reproducción y el comportamiento de animales y humanos y de sus progenies.

La atrazina es un herbicida ampliamente usado a nivel mundial, que ejerce su acción a través de la inhibición de la fotosíntesis. Posee probada actividad de PE en diferentes especies y su principal efecto se asocia a su capacidad desmasculinizante de las gónadas en peces teleósteos, anfibios, reptiles y mamíferos. Se habla de "desmasculinización" de las gónadas masculinas como una disminución en las características gonadales masculinas, que incluyen disminuciones en el tamaño testicular, disminución en el número de células de Sertoli, disminución en la producción de espermatozoides y disminución en la producción de andrógenos.

Dados estos antecedentes, nos propusimos profundizar en el conocimiento respecto a la biología del desarrollo y fisiología del sistema reproductor del yacaré overo, investigar las complejas interacciones entre genes y ambiente y establecer nuevas vías de acción de PEs, analizando consecuencias de la exposición prenatal a contaminantes PEs de origen industrial y aplicación agrícola a nivel molecular, celular, tisular y orgánico.

Para ello, huevos de *C. latirostris* fueron recolectados poco después de la oviposición (previo al PTS), de una región ubicada en un área protegida (Reserva Natural "El Cachapé") en la provincia de Chaco, Argentina. Esta región, se caracteriza por una baja a moderada intervención antrópica. Los huevos fueron transportados al laboratorio e incubados a una temperatura constante de 30°C (TPH) ó a una temperatura constante de 33°C (TPM).

Para definir la etapa de desarrollo de los embriones de *C. latirostris* se siguieron criterios ya establecidos y al momento en que los embriones mostraran las características propias del estadio 20 de desarrollo embrionario, se aplicaron los tratamientos tópicamente sobre la cáscara del huevo, en una única dosis, antes del PTS. Quedando establecidos los diferentes grupos experimentales. A los 30°C (temperatura de producción de hembras- TPH) los huevos recibieron vehículo (50 µl de etanol absoluto), con el fin de estudiar las gónadas embrionarias femeninas obtenidas por temperatura (hembras-DST). A los 33°C (temperatura de producción de machos-TPM), los huevos recibieron diferentes tratamientos: por un lado, recibieron vehículo (50 µl de etanol absoluto), con el fin de estudiar las gónadas de embriones machos obtenidas por temperatura (machos-DST). Otro grupo recibió una dosis de 1,4 ppm de 17β-estradiol, para estudiar las gónadas de hembras obtenidas por acción de los estrógenos (hembras-DSE<sub>2</sub>) y el último grupo lo formaron huevos incubados a TPM topicados con una dosis ambientalmente relevante (0,2 ppm) de Atrazina (ATZ), con el fin de evaluar la acción de este compuesto considerado como un potencial PE (Machos-DST-ATZ). Se seleccionaron tres estadios de desarrollo embrionario para el estudio: estadio 22 (E22), correspondiente al inicio del PTS, estadio 24 (E24) hacia el final de PTS y estadio 27 (E27) hacia el final del desarrollo embrionario. En cada estadio, se obtuvieron las muestras de complejo GAM (Gónada-Adrenal-

Mesonefro) para realizar las diferentes determinaciones en las gónadas embrionarias. Se abarca de este modo, desde el principio hasta el final de la determinación sexual y la diferenciación sexual embrionaria.

Nos propusimos evaluar las características histo-morfológicas de la gónada embrionaria en los tres estadios estudiados y en todos los grupos experimentales mediante el procesamiento histológico del complejo GAM y posterior tinción tricrómica con picrosirius-hematoxilina. Además, nos planteamos establecer la ontogenia embrionaria gonadal de la expresión de proteínas implicadas en la proliferación celular (PCNA), daño del ADN (p63) y la apoptosis, como así también de la expresión de receptores hormonales: receptor de estrógenos  $\alpha$  (RE $\alpha$ ) y receptor de progesterona (RP). Se realizó mediante procesamiento histológico y posterior inmunohistoquímica. Con el fin de evaluar la presencia de la enzima aromatasa específica para *C. latirostris*, en los diferentes estadios de desarrollo embrionario; debimos generar una proteína recombinante Glutación-S-Transferasa-Aromatasa con el objetivo de utilizarla como antígeno para la producción de un anticuerpo policlonal anti-Aromatasa. Por otra parte, dado que el tamaño y disposición de las gónadas embrionarias no permiten que las mismas sean disecadas de manera quirúrgica, se obtuvieron las gonadas aisladas mediante la técnica de micropunción de Palkovits, y luego de esto se evaluó la expresión del ARNm de genes implicados en la determinación sexual y/o diferenciación gonadal: amh, sox9, sf1, aromatasa, mediante RT-PCR.

Los resultados de nuestro trabajo se presentaron comparando por un lado, los aspectos sexualmente dimórficos de la DST, analizando machos-DST y hembras-DST. Por otro lado, se estudiaron comparativamente las hembras, aquellas obtenidas por DST y las obtenidas por DSE<sub>2</sub>. Finalmente, se evaluaron las características gonadales embrionarias de los machos, comparando aquellos obtenidos por DST y expuestos a vehículo (condición control) con aquellos obtenidos por DST pero expuestos a ATZ.

En primera instancia, la evaluación de las características histo-morfológicas y la expresión de diferentes moléculas claves en el desarrollo embrionario a 30°C (TPH) y 33°C (TPM), nos permitió ampliar el conocimiento sobre el desarrollo ovárico y testicular embrionario de esta especie. Hallamos dimorfismo sexual presente entre las gónadas de hembras y machos de *C. latirostris* obtenidas por DST, en tres etapas del desarrollo embrionario (22, 24 y 27). La histoarquitectura gonadal embrionaria fue claramente diferente entre ambos grupos experimentales en el estadio 27 de desarrollo. Además, demostramos que las gónadas embrionarias muestran también diferencias en la expresión proteica de los receptores de estrógenos y progesterona de acuerdo al sexo, así como en la expresión de la enzima aromatasa. Observamos también, dimorfismo sexual en la proliferación celular y la posible incidencia de daño del ADN en las células germinales a través de la expresión de p63 en hembras. Finalmente, en la expresión génica hallamos patrones de expresión sexualmente dimórficos en

todos los genes evaluados *amh*, *sox-9* y *cyp19-a1* (aromatasa) y *sf-1*. Ampliando de este modo el conocimiento sobre la determinación sexual y diferenciación gonadal de esta especie a nivel embrionario.

Al analizar las similitudes y diferencias de las gónadas femeninas de *C. latirostris* en tres etapas del desarrollo embrionario, obtenidas por DST y DSE<sub>2</sub>, demostramos que la histoarquitectura gonadal comienza a mostrar diferencias entre estas hembras en la etapa embrionaria 24. Además, las gónadas de hembras-DSE<sub>2</sub> muestran alteraciones en la expresión proteica de los receptores de estrógenos y progesterona, así como en la expresión de la enzima aromatasa, viéndose un incremento de la misma. Observamos también, un desequilibrio entre la proliferación celular y la apoptosis y la posible incidencia de daño del ADN en las células germinales en estas hembras, a través de la expresión de p63. Finalmente, hallamos diferencias entre estas hembras DST y DSE<sub>2</sub> en la expresión de genes claves en el desarrollo gonadal como *amh*, *sox-9* y *cyp19-1a* (aromatasa), en los estadios de desarrollo de mayor sensibilidad al ambiente, correspondientes al PTS. En resumen, nuestros resultados muestran que tanto en las condiciones DST como DSE<sub>2</sub> se producen ovarios en embriones de *C. latirostris*. Sin embargo, esas gónadas son diferentes entre sí. Los cambios demostrados en embriones hembras-DSE<sub>2</sub> reflejan la idea de que los compuestos ambientales con actividad estrogénica comprobada podrían alterar la funcionalidad ovárica de *C. latirostris* adulto, poniendo en peligro su salud reproductiva y el equilibrio de las poblaciones silvestres en el ecosistema.

Con el objetivo de evaluar la acción de una sustancia con probada acción perturbadora endocrina, decidimos estudiar los efectos de la exposición *in ovo* a atrazina sobre la determinación sexual de *C. latirostris*. Encontramos modificaciones en la histoarquitectura testicular embrionaria en estadio 27 y cambios en moléculas claves del desarrollo gonadal, tanto a nivel proteico como a nivel génico, dos genes netamente vinculados a la diferenciación gonadal hacia testículo: *amh* y *sox-9*, se vieron modificados por la acción de atrazina. Pudimos describir el aumento de la expresión de aromatasa gonadal; la exposición a ATZ modificó de este modo, moléculas de la vía estrogénica. Se alteró también, la proliferación celular en los machos-ATZ, lo que podría estar relacionado a un mayor daño en el ADN de células germinales, ya en etapas tan tempranas como las del desarrollo embrionario. En resumen, todos los efectos generados, refuerzan la acción perturbadora endocrina ya comprobada de la atrazina, feminizando los tejidos reproductores masculinos. Esto es especialmente significativo en términos del impacto que la atrazina ambiental podría tener sobre el desarrollo y la reproducción de *C. latirostris* y tal vez sobre otras especies de vida silvestre.

# ABSTRACT

The knowledge about the molecular and physiological bases that determine sex in reptiles is still incomplete. Sexual determination is the process that guides bipotential (undifferentiated) gonads to develop into testicles or ovaries. It can be initiated by the activation of a specific gene (in species with genetic sex determination - pure - DSG) or the influence of the environment (in species with thermo-dependent sexual determination -TSD-for example) or it can have elements of both. Gonadal differentiation refers to the development of specialized sexual organs (testicles or ovaries).

The sex of the offspring of all the crocodilian species and many species of turtles is determined by the environment. The incubation temperature of the eggs during a critical period of development (thermosensitive period-TSP-) is the main factor that determines sex in the absence of sex chromosomes.

In turn, in birds and reptiles, estrogens are essential for ovarian development. Estrogens can nullify the temperature and induce ovarian differentiation even at masculinization temperatures. The administration of 17 $\beta$ -estradiol during the TSP cancels the effects of the producing temperature of males, producing phenotypic females in *T. scripta* and *A. mississippiensis* among others. This effect has been defined as sex determination induced by estrogen (E<sub>2</sub>SD).

*C. latirostris*, yacaré overo, is one of the two species of crocodilian that habit in Argentina. It is a reptile with TSD; as already mentioned, eggs incubated at 30-31°C produce 100% of female offspring, while eggs incubated at 33-34°C produce 100% of male offspring. The production temperature of females (TPF: 30°C) and that of males (TPM: 33°C) are defined.

In general, it is accepted that temperature initiates a cascade of molecular events that favor the development of one sex or another, altering the control of gene expression and cell signaling of steroid hormones, hormone receptors and steroidogenic enzymes. Some molecular events may precede the formation of the histological architecture that characterizes a testicle or an ovary. Numerous thermo-sensitive genes are involved in gonadal differentiation in species with TSD: *amh*, *sox-9*, *sf-1* and the gene coding for aromatase (*cyp19-a1*), among others. In some species of turtles with TSD, aromatase activity is higher in gonads from eggs incubated at TPF. In 10-day-old yacarés we have already shown that the mRNA expression of *amh* and *sox9* is sexually dimorphic, with higher levels in males than in females. To itself, estrogens are capable of modifying the expression of different genes as has already been seen in fish, turtles and crocodilians, among them we have shown in our work group that the expression of *sox-9* is altered in females of *C latirostris*, in postnatal stage, whose sexual determination was induced by estrogen.

It is known that many pollutants present in the environment, commonly known as endocrine disrupting chemicals (EDCs), have the potential to alter the homeostasis of the endocrine



system affecting the health, reproduction and behavior of animals and humans and their progenies.

Atrazine is a widely used herbicide worldwide, which exerts its action through the inhibition of photosynthesis. It has proven EDC activity in different species and its main effect is associated with its ability to demystify the gonads in teleost fish, amphibians, reptiles and mammals. There is talk of "desmasculinization" of male gonads as a decrease in male gonadal characteristics, which include decreases in testicular size, decrease in the number of Sertoli cells, decrease in sperm production and decrease in androgen production.

Given these antecedents, we set out to deepen our knowledge regarding the biology of the development and physiology of the reproductive system of the yacaré overo, to investigate the complex interactions between genes and the environment and to establish new action pathways for PEs, analyzing the consequences of prenatal exposure to pollutants PEs of industrial origin and agricultural application at the molecular, cellular, tissue and organic levels.

For this, eggs of *C. latirostris* (yacaré overo) were collected shortly after oviposition (prior to the PTS), from a region located in a protected area (Natural Reserve "El Cachapé") in the province of Chaco, Argentina. This region is characterized by a low to moderate anthropic intervention. The eggs were transported to the laboratory and incubated at a constant temperature of 30°C (TPF) or at a constant temperature of 33°C (TPM).

To define the stage of development of *C. latirostris* embryos, criteria already established were followed and at the time when the embryos showed the characteristics of embryonic development stage 20, the treatments were applied topically to the egg shell, in a single dose, before the TSP. The different experimental groups are established. At 30°C-FTP the eggs received vehicle (50 µl of absolute ethanol), in order to study the female embryonic gonads obtained by temperature (TSD-females). At 33°C -TPM, the eggs received different treatments: on the one hand, they received vehicle (50 µl of absolute ethanol), in order to study the gonads of male embryos obtained by temperature (TSD-males). Another group received a dose of 1.4 ppm of 17β-estradiol, to study the gonads of females obtained by the action of estrogens (E<sub>2</sub>SD-females) and the last group formed eggs incubated at TPM topicated with an environmentally relevant dose (0, 2 ppm) of atrazine (ATZ), in order to evaluate the action of this compound considered as a potential PE (TSD- ATZ -males). Three stages of embryonic development were selected for the study: stage 22 (E22), corresponding to the start of PTS, stage 24 (E24) towards the end of PTS and stage 27 (E27) towards the end of embryonic development. In which the samples of GAM complex (Gonad-Adrenal-Mesonephro) were obtained to perform the different determinations in the embryonic gonads. It is encompassed in this way, from the beginning to the end of sexual determination and embryonic sexual differentiation.

We aimed to evaluate the histo-morphological characteristics of the embryonic gonad in the three stages studied and in all the experimental groups by means of the histological processing of the GAM complex and subsequent trichrome staining with picosirius-hematoxylin. In addition, we set out to establish the gonadal embryonic ontogenesis of the expression of proteins involved in cell proliferation (PCNA), DNA damage (p63) and apoptosis, as well as the expression of hormone receptors: estrogen receptor  $\alpha$  (RE $\alpha$ ) and progesterone receptor (PR). It was performed by histological processing and subsequent immunohistochemistry. In order to evaluate the protein presence of the aromatase enzyme specific for *C. latirostris*, in the different stages of embryonic development; We had to generate a recombinant Glutathione-S-Transferase-Aromatase protein with the aim of using it as an antigen for the production of a polyclonal anti-Aromatase antibody. On the other hand, given that the size and disposition of the embryonic gonads do not allow them to be dissected surgically, isolated gonads were obtained by the Palkovits micropuncture technique, and after that the expression of the mRNA of genes was evaluated. involved in sexual determination and / or gonadal differentiation: *amh*, *sox9*, *sf1*, *cyp19-a1*, by q-PCR.

The results of our work were presented by comparing, on the one hand, the sexually dimorphic aspects of the TSD, analyzing TSD-males and TSD-females. On the other hand, the females were studied comparatively, those obtained by TSD and those obtained by E<sub>2</sub>SD. Finally, the embryonic gonad characteristics of the males were evaluated, comparing those obtained by TSD and exposed to vehicle (control condition) with those obtained by TSD but exposed to ATZ.

In the first instance, the evaluation of the histo-morphological characteristics and the expression of different key molecules in the embryonic development at 30 ° C (FPT) and 33 ° C (TPM), allowed us to expand the knowledge about embryonic ovarian and testicular development of this species. We found sexual dimorphism present between the gonads of females and males of *C. latirostris* obtained by DST, in three stages of embryonic development (22, 24 and 27). The embryonic gonad histoarchitecture was clearly different between both experimental groups at stage 27 of development. In addition, we show that embryonic gonads also show sexual dimorphism in the protein expression of estrogen and progesterone receptors, as well as in the expression of the aromatase enzyme. We also observed sexual dimorphism in cell proliferation and the possible incidence of DNA damage in germ cells through the expression of p63 in females. Finally, in gene expression we found sexually dimorphic expression patterns in all genes evaluated *amh*, *sox-9*, *cyp19-a1* (aromatase) and *sf-1*. Expanding in this way the knowledge about sexual determination and gonad differentiation of this species at the embryonic level.

When analyzing the similarities and differences of the female gonads of *C. latirostris* in three stages of embryonic development, obtained by TSD and E<sub>2</sub>SD. We demonstrate that the gonadal

histoarchitecture begins to show differences between these females in the embryonic stage 24. In addition, the gonads of E<sub>2</sub>SD-females show alterations in the protein expression of the estrogen and progesterone receptors, as well as in the expression of the aromatase enzyme, Seeing an increase in it. We also observed an imbalance between cell proliferation and apoptosis and the possible incidence of DNA damage in the germ cells in these females, through the expression of p63. Finally, we found differences between these females TSD and E<sub>2</sub>SD in the expression of key genes in gonad development such as *amh*, *sox-9* and *cyp19-a1* (aromatase), in stages of development of greater sensitivity to the environment. In summary, our results show that in both conditions they produce ovaries in *C. latirostris* embryos. However, those gonads are different from each other. The changes demonstrated in female embryos- E<sub>2</sub>SD reflect the idea that environmental compounds with proven estrogenic activity could alter the ovarian functionality of adult *C. latirostris*, endangering their reproductive health and the balance of wild populations in the ecosystem.

In order to evaluate the action of a substance with proven endocrine disruptive action, we decided to study the effects of *in ovo* to atrazine exposure on the sexual determination of *C. latirostris*. We found modifications in the embryonic testicular histoarchitecture in stage 27 and changes in key molecules of gonadal development, both at the protein level and at the gene level, two genes clearly linked to the gonadal differentiation to the testicle: *amh* and *sox-9*, were modified by the atrazine action. We were able to describe the increase in gonadal aromatase expression, modifying molecules of the estrogenic pathway. The cell proliferation in the ATZ males was altered, which could lead to greater damage in the germ cell DNA. As early stages as those of embryonic development. In summary, all the effects generated reinforce the already proven endocrine disturbing action of atrazine, feminizing the male reproductive tissues. This is especially significant in terms of the impact that environmental atrazine could have on the development and reproduction of *C. latirostris* and perhaps on other wildlife species.

# **1. INTRODUCCIÓN**

### 1.1 Determinación sexual y diferenciación gonadal.

El conocimiento sobre las bases moleculares y fisiológicas que determinan el sexo en los reptiles es aún incompleto. La **determinación sexual** es el proceso que guía a las gónadas bipotenciales (indiferenciadas) a desarrollarse en testículos u ovarios. Puede iniciarse mediante la activación de un gen específico (en especies con determinación sexual genética -pura- DSG) o la influencia del ambiente (en especies con determinación sexual termo-dependiente -DST- por ejemplo) o puede tener elementos de ambos. La **diferenciación gonadal** se refiere al desarrollo de órganos sexuales especializados (testículos u ovarios). Según estas definiciones, el proceso de determinación sexual guía a la diferenciación gonadal y finaliza cuando el desarrollo gonadal queda comprometido irreversiblemente a ser un testículo o un ovario[1].

#### 1.1.1 Determinación sexual genética.

Existen genes determinantes del sexo, uno o varios, que pueden o no localizarse en un cromosoma sexual. Estos genes corresponden a una serie alélica en donde masculino (m) es dominante frente a hermafroditismo (h), y hermafroditismo dominante frente a femenino (f). Este sistema es muy habitual en plantas. Así, los individuos machos serán los que presenten genotipos mm, mh y mf; hermafroditas los de genotipo hh y hf y únicamente los genotipos ff serán de hembras[2].

#### 1.1.2 Determinación sexual Cromosómica.

Mediada por cromosomas sexuales, pudiendo diferenciar entre la presencia de heterocromosomas o por el contrario, de un solo cromosoma sexual.

##### *a) Sistema XY*

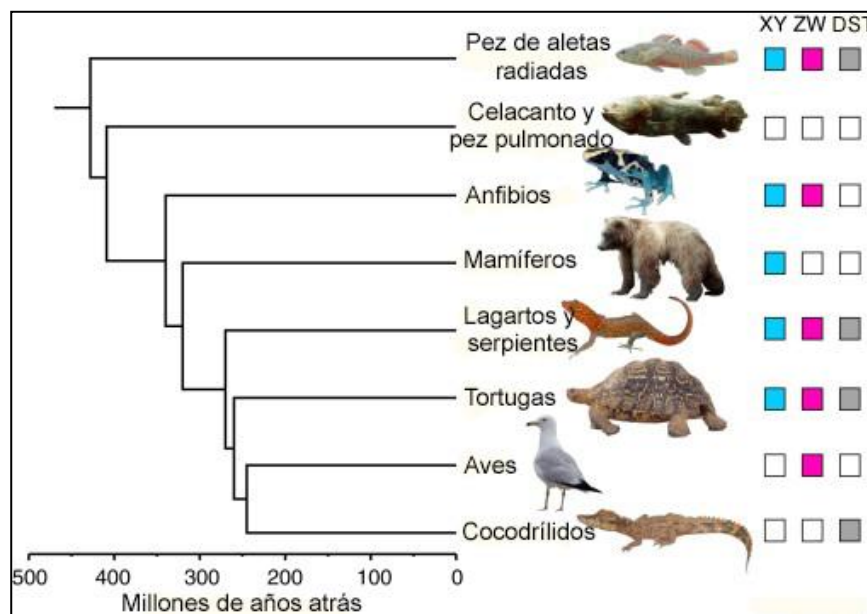
Es el sistema de determinación en humanos y mayoría de mamíferos, así como equinodermos, moluscos y algunos artrópodos. El cromosoma Y es el determinante de masculinidad. Las hembras son el sexo homogamético y por tanto tienen dos cromosomas sexuales homólogos (XX), mientras que los machos son el sexo heterogamético y tienen dos cromosomas distintos (XY). El cromosoma Y es el determinante de masculinidad gracias a la presencia en él de una serie de genes que determinan el desarrollo gonadal. La señal primaria para la distinción testicular de la gónada indiferenciada, que en un principio es bipotencial, es la presencia y expresión del gen *Sry*. Este gen se localiza en el brazo corto del cromosoma Y. Es el testículo el que una vez diferenciado producirá las hormonas que controlarán la diferenciación de los genitales masculinos internos y externos. En el caso de las hembras la ausencia del gen *Sry* ocasiona que la gónada se desarrolle como ovario y los genitales como femeninos. Pero además de este gen existen otros muchos que determinan el desarrollo en uno u otro sentido del individuo[3].

##### *b) Sistema ZW*

Existen dos cromosomas sexuales, W y Z. Los individuos heterogaméticos, ZW, son las hembras, y los homogaméticos los machos, ZZ. Este sistema es el habitual en aves, mariposas, algunos anfibios y reptiles y, dada su enorme variedad de mecanismos de determinación, también en algunos peces.

La gran diversidad de formas en la que se determina el sexo, indica que las transiciones entre los mecanismos determinantes han ocurrido repetidamente a lo largo del árbol de la vida. Estas transiciones se ilustran claramente cuando los mecanismos de determinación del sexo se muestran en un contexto filogenético (Fig. 1). Algunas transiciones son antiguas y han dado lugar a mecanismos de determinación del sexo relativamente estables en todos los miembros de un mismo clado.

Por lo tanto, un sistema XX/XY regulado por *Sry* se encuentra virtualmente en todos los mamíferos térmicos; un sistema ZZ/ZW está presente en todas las aves, incluidas las ratites (por ejemplo, avestruces y emúes); y la DST ocurre en todos los cocodrilos. En otros casos, las transiciones se han producido entre especies estrechamente relacionadas o incluso entre poblaciones dentro de una sola especie. Por ejemplo, los sistemas ZZ/ZW y XX/XY se encuentran entre las diferentes poblaciones de la rana japonesa, *Glandirana rugosa* (Temminck and Schlegel, 1838 – *Anura, Ranidae*) , y la heterogamia femenina evoluciona al menos dos veces de forma independiente dentro de la misma especie[4].

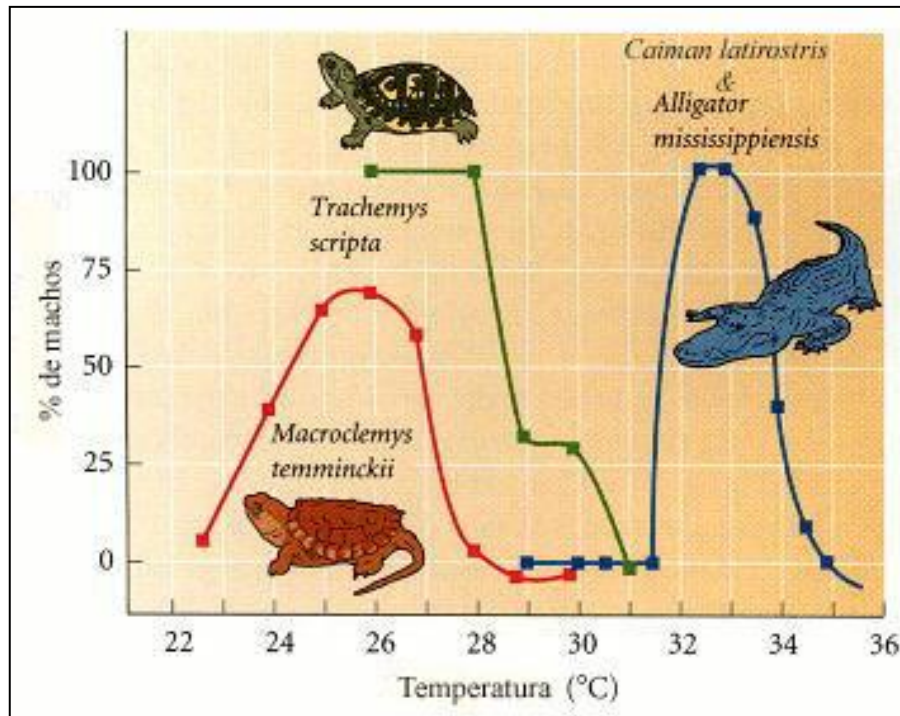


**Figura 1:** Diferentes mecanismos de determinación sexual entre los principales clados de los vertebrados óseos. Algunos grupos muestran un único mecanismo para todas las especies del mismo clado, mientras que otros utilizan varios mecanismos y hay casos en los cuales el proceso de determinación sexual. Modificada de Gamble y col., 2012 [4].

### 1.1.3 Determinación sexual Ambiental

#### 1.1.3.1 Determinación dependiente de temperatura

Después de la fertilización de los ovocitos, el sexo de las crías de todas las especies de cocodrilidos y muchas especies de tortugas está determinado por el medio ambiente. La temperatura de incubación de los huevos durante un período crítico de desarrollo (período termosensible-PTS-) es el principal factor que determina el sexo de la progenie en ausencia de cromosomas sexuales[5]. Se ha encontrado que los cambios de temperatura afectan la diferenciación sexual de las gónadas, sólo durante un cierto período en la incubación de los huevos de reptiles. Este período generalmente corresponde a los primeras etapas de la diferenciación de la histología gonadal [6]. Se ha determinado, de manera experimental, tanto para *Alligator mississippiensis*, aligátor americano (Daudin, 1802 -*Crocodylia*, *Alligatoridae*) como para *Caiman Latirostris*, yacaré overo (Daudin, 1802 -*Crocodylia*, *Alligatoridae*) los rangos de temperatura para obtener el 100% de animales de un mismo sexo y el período ventana de sensibilidad a la temperatura. Así, para estas especies una temperatura de incubación constante a 30-31°C produce el 100% de crías hembras, 32°C produce aproximadamente 70% de hembras, y la incubación a 33-34 ° C produce solo machos. El rango de temperatura de variación en el porcentaje de machos y hembras es >31°-<33°C [7-9]. A su vez, el PTS abarca el tercer tercio de desarrollo embrionario, entre los estadios 21 a 24 y coincide con la diferenciación gonadal [10,9]. A su vez, las especies estudiadas del orden *Crocodylia* tienen un patrón de determinación sexual por temperatura donde la incubación a temperaturas intermedias produce principalmente machos, mientras que la incubación a temperaturas bajas y altas produce principalmente hembras [11-12,10]. Por otra parte, la tortuga *Trachemys scripta*, tortuga de orejas rojas, (Thunberg in Schoepff, 1792 – *Testudines*, *Emydidae*), la temperatura de incubación para la obtención de machos es de 26°C y la de hembras 32°C. Es decir, que los rangos de temperatura de determinación de sexo están invertidos respecto a los aligátors[13] tal como se muestra en la figura 2.

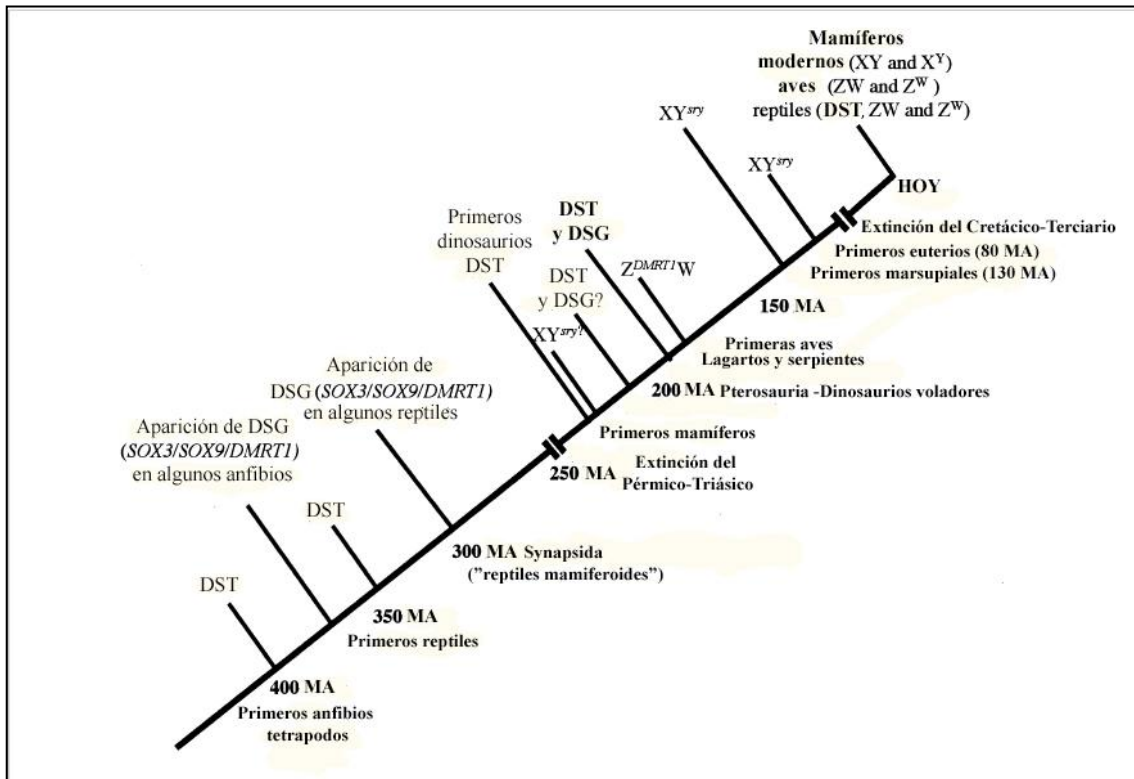


**Figura 2:** Patrones de determinación sexual por temperatura en cuatro especies de reptiles. Modificada de Gilbert, 2000 [12].

#### 1.1.4 Evolución de la determinación sexual

Los dinosaurios y los cocodrilos son miembros de *Archosauria*, un importante grupo de diapsidos que apareció en el período triásico temprano, hace unos 245 millones de años (m.a). Para el período Triásico tardío (225 m.a), los representantes dominantes eran dinosaurios, campeosaurios, pterosaurios y cocodrilos [14]. En este escenario, se asume que la DST ha sido la forma dominante de determinación sexual durante gran parte de la era Paleozoica de 500 a 245 m.a. (Fig. 3). Se sugiere que la DSG (ambas formas XY y ZW) evolucionó en algunos grupos anfibios y reptiles (notablemente sinapsidos y fenodontes) antes del evento de extinción pérmica (P-T) de 245 m.a atrás. Los Archosaurios probablemente no habían desarrollado DSG en el momento de su aparición a mediados del Triásico, pero habría surgido una forma ZW en el grupo que dio origen a las *Ornithuridae*. Al igual que los anfibios y los peces, estos reptiles y los primeros mamíferos desarrollaron independientemente un conjunto homomórfico "primitivo" de cromosomas sexuales (XY o ZW) derivados de autosomas ancestrales. Con el tiempo, las regiones no recombinantes en Y y W contribuyeron a un proceso de decadencia y reducción que ha llevado a cromosomas sexuales marcadamente heteromórficos en euterios y marsupiales (XY) y en aves y víboras (ZW).





**Figura 3:** Cronología de la determinación sexual durante el tiempo geológico. Modificada de Miller y col., 2004.[15]

### 1.1.5 Determinación sexual inducida por estrógenos (DSE<sub>2</sub>).

En los vertebrados en general, los estrógenos son esenciales para el desarrollo ovárico. Los estrógenos pueden anular la temperatura e inducir la diferenciación ovárica incluso a temperaturas de masculinización[12]. La administración de 17 $\beta$ -estradiol durante el PTS anula los efectos de la temperatura productora de machos, produciendo hembras fenotípicas en *T. scripta* y *A. mississippiensis* entre otros [16,13,17]. Este efecto se ha definido como reversión del sexo o determinación del sexo inducida por estrógenos (DSE<sub>2</sub>) [18-22]. Además, se ha propuesto la administración de 17 $\beta$ -estradiol durante el PTS como una forma alternativa de mejorar la recuperación de especies de reptiles amenazadas, al inclinar la proporción de población por sexos a una que favorezca a las hembras reproductoras [23]. A su vez, la DSE<sub>2</sub> también se ha descrito en *C. latirostris* [8-9].

Existe un acuerdo general de que en la determinación del sexo en la hembra, la aplicación de estrógenos es el equivalente fisiológico de la temperatura de incubación [13]. Los estrógenos actúan principalmente a través de sus receptores específicos y los niveles de expresión del receptor pueden reflejar la sensibilidad de un órgano/ tejido a estos esteroides. Los estrógenos están implicados en la diferenciación de las gónadas, maduración del tracto reproductivo y comportamiento durante el apareamiento [24-25].

Además, se ha observado que en huevos de tortugas, aligátores y yacarés, tratados con xenoestrógenos, la determinación sexual de los machos también puede verse alterada [16-17,9,26].

Es por este motivo que reviste tanta importancia el estudio de la inducción sexual mediante estrógenos en especies con DST como biomarcador para la evaluación de compuestos con potencial acción de perturbación endocrina.

## 1.2 Genes implicados en la diferenciación gonadal.

Cada estadio de la diferenciación gonadal en vertebrados, está gobernado por numerosos genes que cumplen diferentes roles e interactúan unos con otros. En reptiles no se ha identificado un gen equivalente al gen SRY que, en mamíferos, actúa como un iniciador en la vía que guía el desarrollo de los testículos[27]. Muchos genes termo-sensibles están implicados en la diferenciación gonadal en especies con DST: *amh*, *sox9*, *sf1* y el gen que codifica para aromatasa (*cyp19a1*); siendo la regulación que unos ejercen sobre otros intensamente estudiada[28-29] (Tabla 1).

En general, se acepta que la temperatura inicia una cascada de eventos moleculares que favorecen el desarrollo de un sexo u otro, alterando el control de la expresión génica y la señalización celular de hormonas esteroides, receptores hormonales y enzimas esteroidogénicas [30]. Algunos eventos moleculares podrían preceder a la formación de la arquitectura histológica que caracteriza un testículo o un ovario [31].

El factor de transcripción, *Sox-9* (SRY box-9), es un miembro de la gran familia de genes *SOX* regulados por el desarrollo que están relacionados en virtud de compartir > 50% de identidad de aminoácidos con la secuencia de HMG (conjunto de proteínas de unión a ADN de *SRY*) [32]. *Sox-9* en ratones y humanos contiene dos dominios de activación transcripcional, lo que indica que es un factor de transcripción típico [33]. *Sox-9* está altamente conservado en el nivel de aminoácidos y el gen muestra regulación positiva testículo-específica en todos los vertebrados examinados hasta la fecha. Este hallazgo indica que *sox-9* puede representar un gen ancestral que determina el sexo y que los mamíferos han evolucionado posteriormente a *SRY* como un mecanismo de unión al cromosoma Y [34].

La hormona antimülleriana (AMH) es la primera proteína conocida secretada por células de Sertoli diferenciadas en el testículo. Por lo tanto, *Sox-9* y *Amh* son dos componentes clave de la determinación de testículos en mamíferos y la diferenciación de estas gónadas [34]. En yacarés de 10 días de edad, se ha demostrado que, la expresión del ARNm de *amh* y *sox9* es sexualmente dimórfica, con niveles más elevados en machos que en hembras[35]. El gen *Sf-1* (Ad4BP) se requiere en mamíferos para la formación de los órganos esteroidogénicos primarios: la glándula suprarrenal y la gónada. *Sf-1* también es probable que tenga un papel en el desarrollo

de testículos. La mutación en *Sf-1* humana da como resultado disgenesia gonadal XY e insuficiencia suprarrenal [36]. *Sf-1* es un receptor nuclear huérfano (ligando desconocido) y tiene un dominio de unión a ADN que comprende dos dedos de zinc altamente conservados. *Sf-1* regula positivamente muchos genes implicados en la esteroidogénesis, incluidos los genes que codifican la aromatasa y la 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa, que están implicados en la producción de estrógenos y testosterona por los linajes celulares esteroidogénicos gonadales [37]. *Sf-1* también regula la expresión de genes no esteroideos en el testículo, como AMH. *Sf-1* se sinergiza con *wt-1* e interactúa con *sox-9* para transactivar el promotor de *amh* in vitro [38]. DAX1 puede reclutar el co-represor N-CoR a *Sf-1* in vitro, reduciendo así su actividad [39]. En todos los vertebrados examinados hasta la fecha, la expresión de *Sf-1* se observa en el primordio gonadal antes de la determinación del sexo, apoyando un papel para SF1 en el establecimiento de una gónada funcional bipotencial. Sin embargo, los cambios en las cantidades relativas de *Sf-1* en las gónadas masculinas y femeninas durante el período de determinación del sexo son notablemente variables entre las especies. En la especie de tortuga de orejas rojas, que utiliza la determinación del sexo dependiente de la temperatura, la expresión de *Sf-1* se mantiene en los machos y se regula negativamente en las hembras durante el período sensible a la temperatura [40]. Sin embargo, en los caimanes, que también usan la determinación del sexo temperatura dependiente, la expresión de *Sf-1* se mantiene en las hembras y se regula negativamente en los machos de la etapa 23, durante el período sensible a la temperatura [41]. En pollos, la expresión de *Sf-1* se mantiene en los machos, pero se regula positivamente en las hembras durante el período de determinación del sexo [42-43].

### **1.3 Rol de la enzima aromatasa en la determinación sexual y diferenciación gonadal.**

La citocromo P450 aromatasa (aromatasa) es la enzima responsable de la conversión de los andrógenos en estrógenos, y como tal desempeña un papel clave en muchas funciones biológicas que dependen de los estrógenos, incluyendo la diferenciación sexual durante el desarrollo embrionario en vertebrados [44]. En algunas especies de tortugas con DST, la actividad de la aromatasa es más alta en gónadas provenientes de huevos incubados a TPH [45-46]. El tratamiento de huevos con un inhibidor de la aromatasa para bloquear la síntesis de estrógenos inhibe el desarrollo ovárico en embriones de cocodrilo incubados a TPH. A pesar de ello, la gónada no se halló totalmente masculinizada [47]. En cambio, en tortugas [48] y aves [49], se ha logrado la masculinización completa de la gónada mediante este tratamiento. Estos datos indican que los estrógenos serían necesarios para el desarrollo gonadal femenino en estas especies y que, en ausencia de estrógenos, se desarrollaría el testículo [50]. Varios estudios realizados en todo el complejo gonadal/adrenal/ mesonefros (GAM) no encontraron diferencias entre las temperaturas de producción de machos y hembras, en el contenido endógeno de

estrógenos, la actividad de la aromatasa o la expresión del gen de la aromatasa durante el PTS para la determinación del sexo [51,50,17]. Esta falta de expresión de la aromatasa gonadal endógena hasta el final del desarrollo llevó a la hipótesis contradictoria de que los estrógenos endógenos no están implicados en la diferenciación ovárica temprana en las especies de TSD. Se propuso que tejidos distintos de las gónadas proporcionan al sitio la sensibilidad térmica primaria, así como la fuente de estrógeno para el desarrollo ovárico temprano. De esta forma, la aromatasa sería un elemento descendente en la cascada de desarrollo de TSD [52]. Sin embargo, los experimentos y ensayos llevados a cabo en gónadas aisladas (separadas de la adrenal / mesonefros) proporcionan evidencia de que las gónadas responden a los cambios de temperatura modificando su diferenciación sexual y son el sitio de la actividad de la aromatasa y la síntesis de estrógenos durante el PTS [53]. Los trabajos realizados en *Xenopus laevis* mostraron que el ovocito participa significativamente en la síntesis de estrógenos ováricos y esto puede ser una característica común de los vertebrados vitelogénicos [54].

**Tabla 1.** Genes, esteroides y enzimas involucrados en la determinación sexual en vertebrados.\*

| Factor determinante del sexo                           | Nombre completo                                   | Definición o función para el desarrollo sexual   |
|--|---|--|
| <b>Gen</b>   |   |  |
| <i>SRY</i>   | Región Y determinante del sexo                    | Principal factor determinante de testículo, localizado en el cromosoma Y. Se encuentra en mamíferos placentarios.  |
| <i>sox9</i>  | SRY-like HMG box                                  | Regula la transcripción del gen de la hormona anti-mülleriana en mamíferos. Involucrado en la diferenciación testicular.   |
| <i>sfl</i>   | Factor 1 esteroideogénico                         | Involucrado en la formación de órganos esteroideogénicos primarios (glándulas adrenales y gónadas). Participa en el desarrollo testicular y en la regulación de <i>amh</i> . |
| <i>wt1</i>   | Gen supresor del tumor de Wilms                   | Factor de transcripción involucrado en el desarrollo urogenital. Necesario para el mantenimiento de los túbulos seminíferos y de las células de Sertoli en mamíferos.        |
| <i>amh</i>   | Hormona anti-mülleriana                           | Regula a la proteína AMH, la cual inhibe el desarrollo de los ductos de Müller y es clave en el desarrollo testicular.   |
| <i>dmrt1</i>   | Doublesex- and mab-3 related transcription factor | Factor de transcripción involucrado en la diferenciación gonadal, pero su rol no está completamente dilucidado.  |
| <i>dax1</i>  | Reversión sexual dosaje-sensible                  | Puede antagonizar la función <i>SRY</i> en mamíferos. Reprime la expresión de <i>sfl</i> y <i>wt1</i> y es importante en la diferenciación ovárica.                          |
| <b>Hormonas esteroides y enzimas esteroideogénicas</b> |   |  |
| DHT  | Dihidrotestosterona                               | Andrógeno no aromatizable, involucrado en el desarrollo testicular.  |
| T  | Testosterona                                      | Andrógeno involucrado en el desarrollo testicular.   |
| E <sub>2</sub>   | 17β-estradiol                                     | Estrógeno involucrado en la diferenciación ovárica.  |
| Aromatasa  | -----   | Enzima que convierte andrógenos en estrógenos.   |
| Reductasa  | -----   | Enzima que convierte testosterona en dihidrotestosterona.  |

\*Con la excepción del gen *SRY*, todos los factores enumerados se encuentran en todos los vertebrados y cumplen funciones similares tanto en especies con DST como en aquellas con DSG.

#### 1.4 Mecanismos de proliferación y muerte celular relacionados con la determinación sexual y diferenciación gonadal.

Como es bien sabido, los procesos de proliferación y apoptosis están estrechamente relacionados con la determinación del sexo y la diferenciación gonadal. La diferenciación ovárica en los caimanes se caracteriza por la proliferación de células germinales en el corteza gonadal [55], mientras que la apoptosis de las células germinales está relacionada con la diferenciación del testículo en algunas especies de peces [56]. Además, se relaciona la apoptosis de células germinales con la pérdida de ovocitos durante el establecimiento de la reserva de folículos primordiales, en la mayoría de los mamíferos hembras [57]. TAp63 es una isoforma de p63, perteneciente a la familia p53 de factores de transcripción. Esta isoforma, es el único miembro de la familia p53 identificado hasta el momento, que participa en la respuesta de daño del ADN en los ovocitos de los mamíferos. TAp63 se ha propuesto como el "guardián de la recombinación meiótica", conduciendo a la apoptosis cualquier ovocito que no reúna sus brazos cromosómicos a tiempo [58]. Esta proteína induce la detención del ciclo celular e inicia la reparación del ADN o la apoptosis en el ratón después del proceso de cruce cromosómico [59]. Generalmente se acepta que la apoptosis gonadal es un proceso hormonalmente regulado. Los estrógenos son reguladores potenciales de la apoptosis gonadal durante la diferenciación sexual en peces [60,56]. A nuestro conocimiento, la presencia de p63 nunca antes se ha descrito en reptiles no avianos.

#### 1.5 *Caiman latirostris* (yacaré overo).

En Argentina, habitan dos especies de cocodrilidos (*Crocodylia: Alligatoridae*); el yacaré overo, ñato o de hocico ancho (*Caiman latirostris* – Daudin, 1802) (Fig.4) y el yacaré negro (*Caiman yacaré* – Daudin, 1802) [61]. Ambas especies comparten gran parte de su distribución, pero *C. latirostris* llega más al sur que *C. yacaré*. [62]. Se ha registrado la existencia de *C. yacaré* en

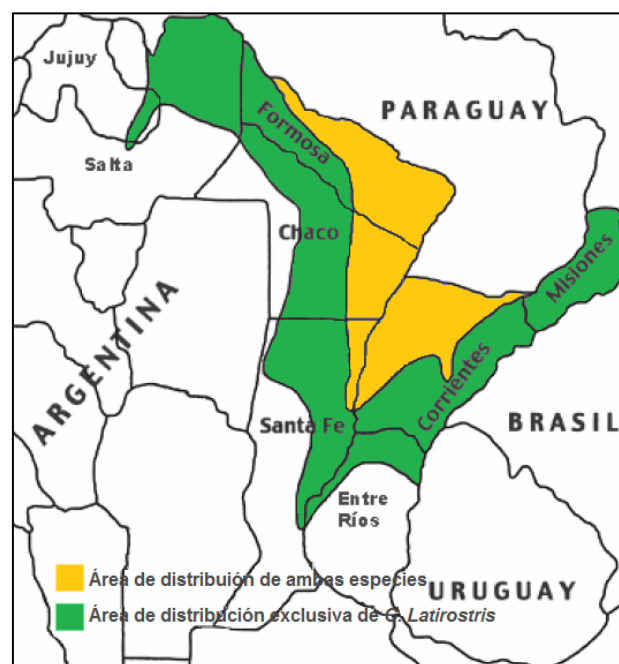


Formosa, Chaco, Corrientes y Santa Fe, mientras que el yacaré overo además llega a Entre Ríos, Misiones, Salta y Jujuy (Fig. 5). La mayor distribución de *C. latirostris* dentro del territorio nacional y su alcance más austral, se debe a que esta especie tiene una mayor tolerancia climática [61]

**Figura 4:** Ejemplar adulto de *C. latirostris*-yacaré overo. Fotografía obtenida en la reserva natural “El Cachapé”- provincia de Chaco.

Los yacarés son reptiles de hábitos anfibios que pasan la mayor parte del tiempo en el agua, donde satisfacen la mayoría de los requisitos de la vida[63]. A su vez, son vertebrados poiquilotermos que alcanzan una longitud máxima aproximada de 2,5 m con un peso de 80-90 kg y son depredadores oportunistas[64].

En Argentina, a partir del año 1990, la situación poblacional de *C. latirostris* ha mejorado debido al desarrollo y aplicación de programas de rancheo que promueven el uso sustentable del yacaré fomentando la conservación de la especie y su hábitat al otorgarle valor económico. En el marco de estos programas se realiza la cría de animales en cautiverio, los cuales son identificados al nacimiento, para luego realizar un seguimiento de los individuos en su hábitat natural. En Argentina, *C. latirostris* ha sido transferido al apéndice II de la Convención Sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre (CITES)[65], lo cual significa que es una especie no amenazada de extinción[66].



**Figura 5:** Distribución geográfica de *C. latirostris* y *C. yacare* en Argentina. Mostrando el área compartida por ambas especies y el área exclusiva de *C. latirostris*. Modificado de Poletta y col. 2009 [67].

### 1.5.1 Biología Reproductiva

La madurez sexual del yacaré ocurre una vez que los animales alcanzan un tamaño aproximado de 120-140 cm. En animales silvestres esto puede tener lugar entre los 6 y 10 años de edad, en

función del ambiente y del estado nutricional [68-70] siendo la expectativa de vida del yacaré semejante al humano.

La reproducción es estacional, el cortejo y la cópula se producen durante la primavera (octubre-diciembre), y los nacimientos ocurren a fines del verano y comienzos de otoño (febrero-abril) [71]. Sin embargo, pueden presentarse desfases debidos a irregularidades en las precipitaciones, temperaturas ambientales y el nivel de las aguas [68]. Durante la época de apareamiento, los individuos con capacidad reproductiva se congregan en cuerpos de agua con cierta profundidad donde ocurre la cópula y la fecundación. Las hembras grávidas construyen, en horario nocturno, un nido en forma de montículo con material característico del lugar en las proximidades del agua, de manera que las crías puedan acceder fácilmente a ella [72-73].

La ovipostura es única [8,74], con un tamaño que varía entre 18 y 50 huevos [75]. Durante la incubación la hembra tiene conducta de vigilancia del nido. Mantiene la correcta humedad del mismo, sea mojándolo o facilitando la pérdida de agua luego de lluvias. Mantiene la temperatura de incubación, promoviendo el proceso de descomposición del material de nido a través de la orina o deposiciones que efectúa sobre él. Sin embargo, no tiene contacto con los huevos hasta el momento de la eclosión [75]

Para lograr una incubación exitosa, la humedad de la cámara de incubación debe estar cerca del 95% y la temperatura promedio debe estar entre los 30°C y los 32°C. *C. latirostris* es un reptil con DST; como ya se ha mencionado, huevos incubados a 30-31°C produce el 100% de crías hembras, y la incubación a 33-34 ° C produce solo machos. Quedan definidas así la temperatura productora de hembras (TPH: 30°C) y la de machos (TPM: 33°C), a temperaturas intermedias dan porcentajes variables de ambos sexos [8-9,76].

Los huevos resisten temperaturas entre 25°C y 36°C, siempre que estas condiciones no se prolonguen en el tiempo [75]. Dependiendo de la temperatura media, el período de incubación dura entre 65 y 90 días. Temperaturas de incubación mayores aceleran el proceso, mientras que temperaturas bajas, lo retardan [77].

Como sucede en la mayoría de los cocodrilidos, la pérdida de individuos durante el proceso de incubación y el primer año de vida, en la naturaleza, alcanza el 90% de los huevos depositados en una temporada [68]. Los factores más influyentes en esta situación son la depredación e inundación durante el período de incubación de los huevos y la sequía, frío y depredación durante el primer año de vida [78].

La estrategia reproductiva de la especie, como en el caso de la mayoría de los reptiles, es producir una frágil pero abundante descendencia, lo que garantiza que al menos unos pocos individuos lleguen a la adultez.



### 1.6 Perturbación endocrina.

Los seres humanos y la vida silvestre están expuestos a numerosos contaminantes hormonalmente activos comúnmente denominados químicos perturbadores endocrinos (PEs) y su presencia pone en riesgo la salud del ecosistema [79]. Los PEs son compuestos exógenos con la potencialidad de alterar la homeostasis del sistema endocrino afectando la salud, la reproducción y el comportamiento de animales y humanos y de sus progenies[80]. Una inmensa variedad de compuestos químicos de uso industrial, agropecuario y/o doméstico contaminan el ambiente y han sido caracterizados como PEs [81]. La mayoría de las sustancias PEs conocidas exhiben actividad estrogénica y se clasifican como xenoestrógenos [82].

Las acciones de los estrógenos están mediadas por una plétora de mecanismos moleculares que constituyen vías diferentes a través de las cuales los PEs desencadenan sus efectos. Los efectos de la exposición medioambiental a los PEs sobre la fauna están ampliamente documentados [83,76,84-86]. Los avances del conocimiento en el campo de la perturbación endocrina han permitido determinar además, efectos sobre el metabolismo y su capacidad de actuar como obesógenos [87]. Actualmente, se reconoce que la exposición a PEs durante etapas críticas del desarrollo pueden generar una mayor susceptibilidad hacia enfermedades no transmisibles tales como cáncer, enfermedades respiratorias crónicas y diabetes mellitus [88]. Estudios hechos en aves indican que el desarrollo gonadal de aves urbanas se da más tempranamente que el de las rurales y esta diferencia se debe al aumento de la actividad endocrina de las mismas [89]. Aunque se reconoce que deberían realizarse más estudios, se ha relacionado la exposición a diversos PEs con la pubertad precoz [90,88]. Debido a la presencia medioambiental de de PEs y la gran variedad de efectos que estos pueden tener sobre los ecosistemas y el hombre, es necesario detectar su presencia a través de signos tempranos de alerta.

Los órganos reproductores de yacaré overo tanto hembras, como machos son altamente sensibles a los efectos de los PEs tales como el endosulfán, la atrazina y el bisfenol A [91,35,76,9]. La exposición prenatal a estrógenos o PEs modifica la dinámica folicular ovárica y los niveles de esteroides hormonales en las hembras posnatales [76]. Otros resultados revelaron que la exposición postnatal temprana a PEs altera el patrón de expresión temporal y espacial de los biomarcadores de diferenciación histofuncional en el oviducto en estadios juveniles y adultos [92]. Dado que *C. latirostris* puede estar naturalmente expuesto a PEs [84-85], la búsqueda de conocimientos sobre el mecanismo de acción de los estrógenos sobre esta especie es de particular interés tanto para evaluar el impacto de los PEs en caimanes, como para caracterizar mejor a *C. latirostris* como monitor biológico de la salud del ecosistema.

### **1.7 Especie centinela.**

Puesto que la presencia de PEs en el medioambiente y sus efectos deletéreos son hechos ampliamente probados, es necesario el control y monitoreo del ecosistema para garantizar la salud del mismo. Una de las formas en las que este control puede realizarse, es a través del estudio de distintas especies domésticas y/o silvestres denominadas organismos centinelas [93]. El concepto de organismo centinela fue definido por Stahl como “cualquier organismo no humano que pueda reaccionar ante un contaminante ambiental, antes de que el contaminante impacte sobre los humanos” [94].

Una de las formas en la cual los organismos centinelas ofrecen información es a través de indicadores precisos y tempranos de alerta o biomarcadores. Un biomarcador, puede definirse como “una respuesta biológica a un compuesto químico o a diferentes compuestos químicos que provee una medida de exposición y a veces, también de efectos tóxicos” [95]. Desde un punto de vista más específico, los biomarcadores son “medidas en los niveles molecular, bioquímico o celular, tanto en poblaciones naturales provenientes de hábitats contaminados, como en organismos expuestos experimentalmente a contaminantes, y que indican que el organismo ha estado expuesto a sustancias tóxicas y la magnitud de la respuesta del organismo al contaminante”.

#### **1.7.1 *Caiman latirostris* como organismo centinela de contaminación ambiental.**

La selección de una especie para ser utilizada como centinela de contaminación ambiental, requiere de la consideración de una serie de atributos[96].

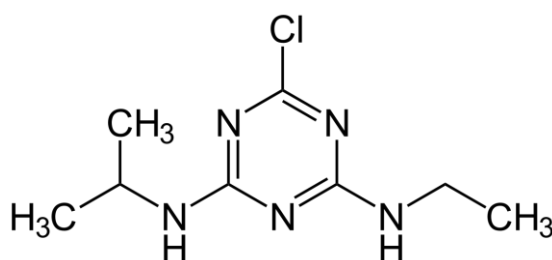
- Tener amplia distribución en la zona a ser evaluada.
- Ser abundante y suficiente para hacer el muestreo estadísticamente significativo y lógicamente posible.
- Tener un tamaño suficientemente grande como para proporcionar adecuadamente las muestras de tejidos y fluidos biológicos necesarias para el estudio de los biomarcadores seleccionados.
- Tener sensibilidad al compuesto o grupo de compuestos que desea evaluarse. La sensibilidad debe ser mayor que la de los seres humanos, para proporcionar una alerta temprana a través de biomarcadores.
- Debe bioacumular el compuesto que desea evaluarse a concentraciones medibles o tener cambios fisiológicos o conductuales medibles en respuesta al agente o tipo de agente en cuestión.
- Tener larga vida, suficiente como para demostrar tanto los efectos inmediatos como los efectos de la exposición en el tiempo, extraer conclusiones sobre la exposición crónica y también sobre posibles efectos a distintos grupos etarios.

- Ser preferentemente territorial y que no posea hábitos migratorios, porque esto refleja que el contaminante en estudio está presente en el lugar. Además esta característica permite evaluar las consecuencias de la exposición a los habitantes de ese preciso lugar.
- Estar en el tope de la red trófica. Esta condición le da el potencial de bioacumular contaminantes locales a los largo de grandes períodos de tiempo.

*C. latirostris* posee características eco-fisiológicas ya descritas como: su amplia distribución geográfica, longevidad, fidelidad al sitio geográfico y posición superior en la red trófica, que lo hacen un buen candidato como organismo centinela. Además, como también se ha mencionado *C. latirostris* ha mostrado ser sensible a los contaminantes ambientales con actividad de PEs.

### 1.8 Atrazina.

La atrazina (2-cloro-4-etilamina-6-isopropilammino-S-tiazina) (Fig. 6), es un herbicida ampliamente usado a nivel mundial, que ejerce su acción a través de la inhibición de la fotosíntesis. Se utiliza en el control de malezas en plantaciones de maíz, sorgo, caña de azúcar, entre otros y en plantas coníferas para reforestación. Además se emplea como herbicida no selectivo en tierras que no se utilizan para cultivo. Se clasifica como Clase II, producto moderadamente peligroso –nocivo[97]. Respecto a su carcinogenicidad para seres humanos es considerada dentro del Grupo 3: No clasificable como carcinógeno [98-99]. La atrazina es altamente persistente en el suelo, no se absorbe en gran medida en sedimentos y es moderadamente soluble en agua. No se hidroliza fácilmente a pH neutro pero sí alejándose de esta condición. Un estudio realizado con muestras de agua de localidades de Mississippi, Ohio y sus alrededores (Estados Unidos), reveló que el total de muestras analizadas contenía atrazina, que persistió en el 27% de las muestras sobre el nivel de concentración máximo definido por la EPA como segura para consumo humano, 3 µg/L. Por su parte el SENASA a nivel nacional, establece un límite máximo definido entre 0,15 y 15 mg/kg de peso, para diferentes tipos de forrajes[100]. El nivel de aplicación recomendado de atrazina varía de 2.500 ppm a 29.300 ppm[101]. La atrazina puede alcanzar hasta 0,1 ppm en cuencas hidrográficas en áreas agrícolas, hasta 0,22 ppm en arroyos y hasta 2,3 ppm en pozos de agua en zonas agrícolas[102].



**Figura 6:** Fórmula química de la atrazina. 2-cloro-4-etilamina-6-isopropilammino-S-tiazina.

En peces se observó que existe una rápida captura de atrazina del agua a través de las branquias, contaminando los otros órganos vía circulación sanguínea.

Varios estudios en anfibios han sugerido que la atrazina se asocia con machos feminizados en la naturaleza [103-105]. En estudios a campo, la atrazina se ha asociado repetidamente con la presencia de ovocitos testiculares [106,105,104,103], así como con características sexuales secundarias feminizadas en las ranas macho [107].

La atrazina es una gonadotoxina en los machos. La atrazina demasculiniza las gónadas de los peces teleósteos expuestos, los anfibios, los reptiles y los mamíferos. Se habla de "demasculinización" de los testículos como una disminución en las características gonadales del macho, que incluyen disminuciones en el tamaño testicular, disminución en el número de células de Sertoli, disminución en la producción de espermatozoides y disminución en la producción de andrógenos [108]. Se ha reportado que la exposición a la atrazina interrumpe el desarrollo testicular, dando como resultado lesiones testiculares (pérdida de tejido testicular) en todas las clases de vertebrados examinadas excepto en aves. En los peces, la atrazina causa la degeneración del tejido intersticial en los testículos, pero no se ha reportado aún si las células germinales o las células de Sertoli son también los blancos [109]. En anfibios [110], reptiles [111] y mamíferos [112-113], sin embargo, la atrazina tiene efectos casi idénticos. La exposición a la atrazina en estas clases de vertebrados produce aumentos en el tamaño de los túbulos testiculares, pérdida de células de Sertoli y una marcada pérdida de células germinales, a menudo dejando los túbulos testiculares vacíos o solo con lo que parecen restos celulares [110,113,111-112].

La atrazina es frecuente y persistente en el medio ambiente. Hay muchos otros efectos reproductivos documentados de atrazina en roedores de laboratorio: aborto inducido [114-116]; desarrollo mamario deteriorado [117], la inducción de cánceres en órganos reproductivos y dependientes de hormonas [118-119] así como otros tipos de cáncer no reproductivos. Se observaron además, efectos sobre el deterioro de la función inmunitaria [120] y el desarrollo neuronal [121-123]. Por lo tanto, todos estos efectos de la atrazina en diferentes hábitats [124-126], hacen que este compuesto pueda ejercer efectos dramáticos en los ecosistemas, la salud ambiental y la salud pública.

## **2. HIPÓTESIS**

### **2.1 Hipótesis general:**

La exposición prenatal a estradiol y a un contaminante ambiental como es la Atrazina, modifican la expresión de moléculas claves en la determinación sexual y la diferenciación gonadal de *Caiman latirostris*.

### **3. OBJETIVOS**

### 3.1. Objetivo general

Profundizar en el conocimiento respecto a la biología del desarrollo y fisiología del sistema reproductor del yacaré overo, investigar las complejas interacciones entre genes y ambiente y establecer nuevas vías de acción de PEs, analizando las consecuencias de la exposición prenatal a Atrazina, un contaminante PE de origen industrial y aplicación agrícola, a nivel molecular, celular, tisular y orgánico.

### 3.2. Objetivos específicos

**A)** En embriones de *Caiman latirostris* (yacaré overo) en distintos estadios de desarrollo e incubados a temperatura productora de hembras (TPH: 30°C) o temperatura productora de machos (TPM: 33°C):

1) Evaluar las características histo-morfológicas de la gónada.

2) Establecer la ontogenia gonadal de:

2.1) expresión de proteínas implicadas en la proliferación celular (PCNA), daño del ADN (p63) y la apoptosis, como así también de la expresión de receptores hormonales: receptor de estrógenos  $\alpha$  (RE $\alpha$ ) y receptor de progesterona (RP).

2.2) expresión del ARNm de genes implicados en la determinación sexual y/o diferenciación gonadal: *amh*, *sox9*, *sf1*, *aromatasa*.

3) Generar una proteína recombinante Glutación-S-Transferasa-Aromatasa con el objetivo de utilizarla como antígeno para la producción de un anticuerpo policlonal anti-aromatasa específico para *C. latirostris*. Con este anticuerpo se evaluará la presencia de la proteína de la enzima mencionada en los diferentes estadios de desarrollo embrionario.

**B)** En embriones de yacaré overo en distintos estadios de desarrollo e incubados a TPM:

4) Determinar si la exposición *in ovo* a 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) o atrazina –ATZ- produce cambios a nivel gonadal en:

4.1) las características morfológicas, la proliferación celular, daño del ADN y la apoptosis, como así también de la expresión de receptores hormonales: receptor de estrógenos  $\alpha$  (RE $\alpha$ ) y receptor de progesterona (RP) y de la enzima aromatasa.

4.2) la expresión gonadal de ARNm de genes implicados en la determinación sexual y/o diferenciación gonadal: *amh*, *sox9*, *sf1*, *aromatasa*.

5) Proponer potenciales mecanismos de acción de ATZ y E<sub>2</sub> sobre los genes que regulan la DST y/o DSE<sub>2</sub>.



## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### 4.1 Recolección y traslado de los huevos

Huevos de *Caiman latirostris* (yacaré overo) fueron recolectados poco después de la oviposición (previo al PTS), de siete nidos seleccionados al azar durante dos temporadas reproductivas diferentes (2013 y 2016), tres y cuatro nidos cada año (tamaño promedio del nido: 35 huevos). Los nidos fueron cosechados de una región ubicada en un área protegida (Reserva Natural “El Cachapé”) en la provincia de Chaco, Argentina. Esta región, caracterizada por una baja intervención antrópica, se sitúa por encima de zonas urbanizadas, industriales y agrícolas, minimizando así la exposición a aguas residuales o a la agricultura y/o al escurrimiento de los lotes de engorde (*feedlots*). Para establecer la edad de los embriones, se abrió un huevo de cada nido a campo. Sólo los nidos con embriones en estadios inferiores a 15 fueron transportados al laboratorio. Antes de ser retirado de cada nido, cada huevo se marcó con un lápiz de grafito para mantener la orientación original del mismo durante el transporte y la incubación en condiciones controladas de laboratorio. Los huevos fueron transportados al laboratorio y distribuidos aleatoriamente en dos grupos, de manera que la mitad de los huevos de un nido fueran incubados a una temperatura constante de 30°C (100% producción de hembras) y la otra mitad a una temperatura constante de 33°C (100% producción de machos) [127,111,9]. El desarrollo de la banda opaca de cada huevo se utilizó para comprobar la viabilidad del embrión [9]. La temperatura fue monitorizada por registro automático de temperatura mediante el dispositivo HOBO (Onset Computer, Pocasset, MA) y por registro diario de lecturas de termómetro electrónico de cada incubadora. Los huevos se mantuvieron a aproximadamente 90% de humedad. Dentro de cada grupo de temperatura de incubación, los huevos de cada nido se distribuyeron de manera equitativa entre los grupos de tratamiento. Sólo un porcentaje de los huevos fueron utilizados en este estudio (n=160), mientras que otros fueron asignados a otros estudios.

#### 4.2. Diseño experimental y obtención de muestras

Se siguieron los criterios definidos por Stoker y col.[9] y Iungman y col. [128] para definir la etapa de desarrollo de los embriones de *C. latirostris*. Estos criterios son consistentes con la serie estándar de Ferguson [129] para *A. mississippiensis*. Dos días después de que los huevos llegaran al laboratorio, se abrió un huevo de cada nido para comprobar el estadio de desarrollo. El procedimiento se repitió cada 7 días, a las dos temperaturas de incubación, hasta el momento en que los embriones mostraran las características propias del estadio 20. Resultados previos[9,35,111] nos permiten estimar este tiempo con mayor exactitud. Todos los embriones fueron examinados bajo lupa estereoscópica Stemi 305 Zeiss (Carl Zeiss Microscopy, Alemania).para establecer una descripción morfológica detallada.

Los tratamientos se aplicaron tópicamente a la cáscara del huevo, sobre la superficie apical del mismo, donde se ubica la banda opaca y donde fue marcado para mantener su posición original en el nido durante el traslado y la incubación. Los tratamientos se aplicaron en una única dosis durante la etapa 20 del desarrollo embrionario antes del PTS para *C. latirostris* [9]. A los 30°C (temperatura de producción de hembras) los huevos recibieron vehículo (50 µl de etanol absoluto), con el fin de estudiar las gónadas embrionarias femeninas obtenidas por temperatura (hembras-DST). A los 33°C (temperatura de producción de machos), los huevos recibieron diferentes tratamientos: por un lado, recibieron vehículo (50 µl de etanol absoluto), con el fin de estudiar las gónadas de embriones machos obtenidas por temperatura (machos-DST). Otro grupo recibió una dosis de 1,4 ppm de 17β-estradiol (Sigma Chemical, St. Louis, MO) para estudiar las gónadas de hembras obtenidas por acción de los estrógenos (hembras-DSE<sub>2</sub>) [9]. Finalmente el último grupo lo formaron huevos incubados a TPM topcados con una dosis de 0,2 ppm de Atrazina, con el fin de evaluar la acción de este compuesto considerado como un potencial PE. La dosis de ATZ se consideró ecológicamente relevante y se ha asociado con hermafroditismo e interrupción gonadal en anfibios [103].

Se seleccionaron tres estadios de desarrollo embrionario para el estudio: estadio 22 (E22), correspondiente al inicio del PTS, estadio 24 (E24) hacia el final de PTS y estadio 27 (E27) hacia el final del desarrollo embrionario. Abarcando desde el principio hasta el final de la determinación sexual y la diferenciación sexual embrionaria (Fig.7).

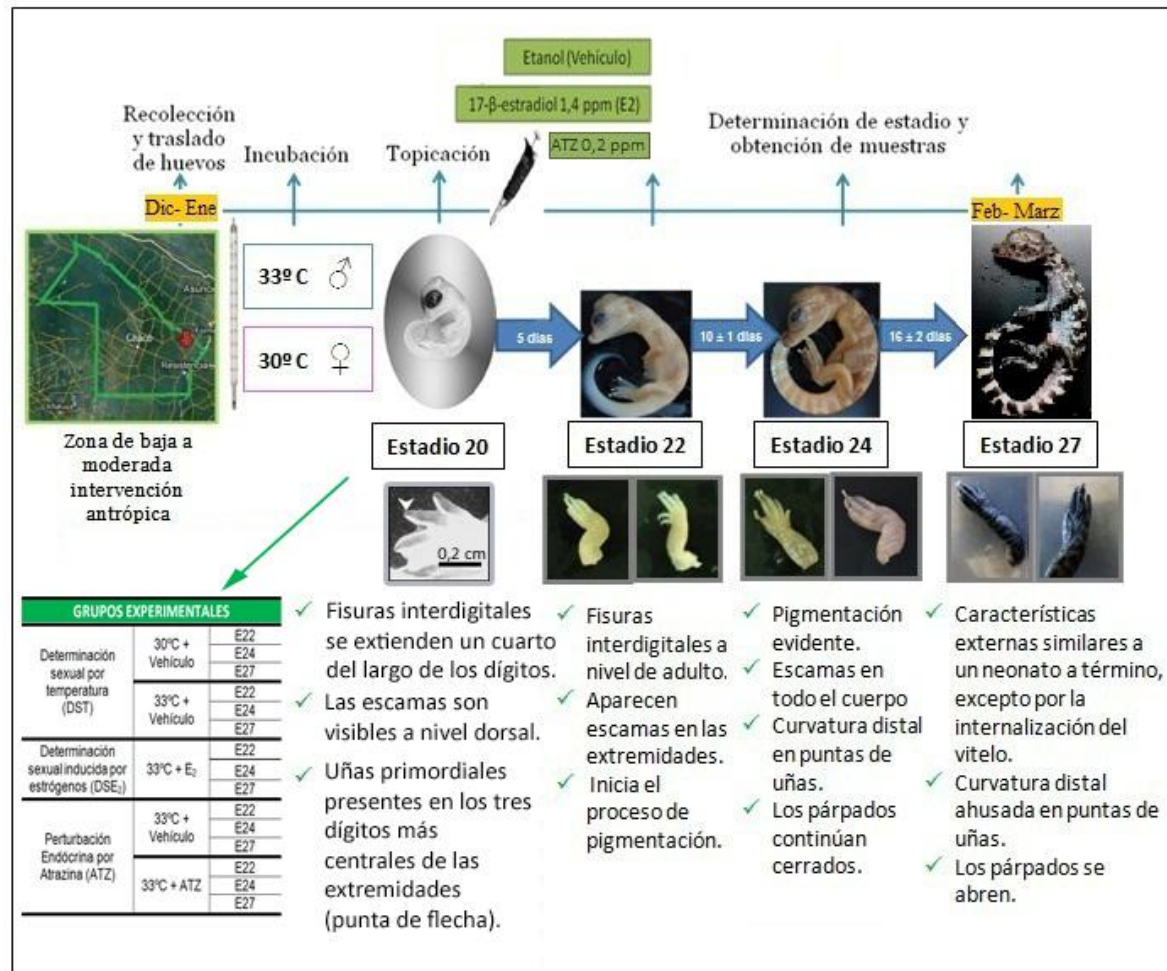
Luego de la apertura de los huevos, los embriones se sacrificaron por decapitación y se verificó inmediatamente su estadio de desarrollo embrionario. Se sacrificaron doce animales por grupo en cada estadio, estos se destinaron a dos metodologías diferentes, que se explican a continuación. Por lo que cada condición quedó conformada por un número de muestras igual a seis ( $n=6$ ).

Todo el trabajo de laboratorio y de campo se realizó de acuerdo con las directrices publicadas para el uso de anfibios y reptiles vivos en investigación de campo y laboratorio [131] y en pleno cumplimiento del Comité Institucional de Bioética en Cuidado y Uso de Animales de la Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

#### **4.3 Procesamiento de muestras:**

Posterior al sacrificio, se diseccionaron ambos complejos GAM bajo lupa estereoscópica Stemi 305 Zeiss (Carl Zeiss Microscopy, Alemania) y se destinaron a dos metodologías diferentes. Por un lado al procesamiento histológico, de esta manera se evaluó la histo-arquitectura gonadal, mediante la tinción histoquímica, picrosirius- hematoxilina y la expresión de proteínas mediante

inmunohistoquímica (IHQ). Por otro lado, las muestras se procesaron en frío sobre hielo seco, para luego ser guardadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su inclusión en OCT, medio sintético que favorece la realización de cortes en criostato a temperaturas bajo cero, con el fin de extraer posteriormente el material genético gonadal, separado del complejo GAM mediante la técnica de micropunción de Palkovitz [132].



**Figura 7:** Secuencia de pasos metodológicos previos a la obtención del complejo GAM. Grupos experimentales. Principales características de cada estadio de desarrollo evaluado.

#### 4.3.1 Procesado Histológico:

**Fijación:** Ambos complejos GAM se fijaron inmediatamente, luego de la disección quirúrgica. El proceso de fijación se llevó a cabo por inmersión en buffer fosfato al 10% (pH 7,4) durante 6 h a temperatura ambiente. Los tejidos ya fijados, se deshidrataron en series ascendentes de etanol, se aclararon en xileno, hasta su inclusión en parafina.

**Coloraciones:** Secciones seriadas (5  $\mu\text{m}$ ) de ambos complejos GAM se cortaron en planos transversales y se tiñeron con la coloración tricrómica picrosirius/ hematoxilina, tal como se

describió anteriormente [76,9]. Se estudiaron secciones transversales con el objetivo de identificar las estructuras embrionarias que darán origen a ovarios o testículos [11] y realizar una descripción histo-morfológica. Se evaluaron al menos tres secciones en cada gónada para determinar si la organización del tejido era consistente en su extensión.

**Inmunohistoquímica:** Se utilizaron técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) para detectar células germinales, células proliferantes, expresión de p63, receptores hormonales (receptores de estrógenos alfa (ER $\alpha$ ) y receptores de progesterona (PR)) y la enzima esteroidogénica aromatasa. La tinción con inmunoperoxidasa permite identificar *in situ* un antígeno celular mediante una reacción antígeno-anticuerpo, que se visualiza gracias a una molécula marcadora. Para la inmunomarcación, se siguió un protocolo previamente publicado, que utiliza el calentamiento de la muestra en horno microondas como método de recuperación antigénica, extravidina-biotina peroxidasa como sistema de revelado y Diaminobencidina (DAB) (Sigma-Aldrich, Buenos Aires, Argentina) como sustrato cromogénico [133], utilizando anticuerpos previamente probados descritos en la Tabla 2. En todos los ensayos se incluyeron controles positivos y negativos. Los cortes inmunomarcados fueron contracolorados con Hematoxilina de Mayer o bien, se dejaron sin contracoloración. El protocolo general empleado se muestra en la Tabla 3.

Para el análisis de imágenes, las mismas se capturaron mediante una cámara de vídeo color SPOT (Diagnostic Instruments, Inc., Arnold, MD) conectada a un microscopio Olympus BH2 (Olympus Optical, Tokio, Japón). El microscopio se calibró para la iluminación de Koehler. La corrección de la iluminación desigual (corrección de sombreado) y la calibración del sistema de medición se realizaron con una imagen de referencia. Las imágenes fueron analizadas utilizando el software ImageJ / Fiji 1.46.

#### **a) Identificación de células germinales**

Con el propósito de identificar las células germinales, se realizó inmunotinción para la proteína VASA. Vasa codifica un tipo DDX4 de ARN helicasa, ATP dependiente. Estas proteínas se expresan en células germinales de la mayoría de los organismos y están implicadas en la regulación de la traducción de los ARNm de la línea germinal [134]. Una vez individualizado, se pudo continuar con su observación morfológica a través de tinción con picrosirius / hematoxilina.

**Tabla 2:** Anticuerpos y kits utilizados en IHQ.

| Anticuerpo  | Generado en...   | Dilución utilizada | Proveedor                     |
|---|--|--------------------|-------------------------------|
| Anti-Receptor de Estrógenos alfa                            | Conejo   | 1/100              | LETH-ISAL*                    |
| Anti-Receptor de Progesterona                               | Conejo   | 1/300              | DAKO-Corporation              |
| Anti-Aromatasa  | Conejo   | 1/2000             | LETH-ISAL*                    |
| Anti- Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (anti-PCNA) | Ratón  | 1/1000             | Novocastra                    |
| Anti-p63  | Ratón  | 1/50               | Santa Cruz Biotechnology Inc. |
| Anti- VASA  | Conejo   | 1/200              | Santa Cruz Biotechnology Inc. |
| Apoptosis mediante TUNEL                                    | In Situ Cell Death Detection Kit, POD -Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science-. |                    |                               |

\*Para los anticuerpos generados en el laboratorio, se utilizaron las secuencias para *A. mississippiensis* para la constricción de los antígenos específicos.

### b) Expresión de receptores hormonales

La expresión de ER $\alpha$  y PR se determinó en el compartimiento total de las gónadas. La reactividad cruzada de anticuerpos anti-ER $\alpha$  se ha probado previamente [135], y la especificidad de anti-PR se ensayó mediante la técnica de Western-blot [92]. La expresión de ER $\alpha$  se cuantificó por análisis de imágenes como se describió anteriormente [135] utilizando el software Fiji de ImageJ. El resultado se expresó como el porcentaje del área con inmunomarca positiva.

### c) Evaluación de la Proliferación Celular, Daño de ADN y Apoptosis

La actividad proliferativa de la gónada se evaluó mediante la expresión del antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA), una molécula altamente conservada asociada con el ciclo de división celular [91]. Se definió un umbral para seleccionar solamente aquellas células intensamente teñidas, ya que representa mejor la fase S del ciclo celular [92]. La expresión se cuantificó mediante análisis de imágenes. El resultado se expresó como porcentaje del área positiva.

TAp63 es una isoforma de p63 perteneciente a la familia p53 de factores de transcripción, que participa en la respuesta al daño del ADN de células germinales en mamíferos [58]. La expresión de p63 se determinó en los grupos de células germinales (previamente identificadas por VASA) a través del análisis de imágenes digitalizadas como se describió previamente [135]. Los resultados se expresaron como densidad óptica integral (IOD), una combinación lineal entre la densidad óptica en escala de grises y la superficie relativa ocupada por células positivas.

Dado que IOD es un parámetro adimensional, los resultados se expresan como unidades arbitrarias.

**Tabla 3:** Protocolo general de la técnica de IHQ

| <b>Desparafinización e hidratación</b>  |  |
|---|--|
| Xilol 1, 2 y 3  | 3 min c/u  |
| Alcohol 100°, 96° y 70°   | 1 min c/u  |
| PBS   | 5 min  |
| <b>Recuperación Antigénica</b>  |  |
| Buffer citrato 0,01M pH 6,00 en microondas  |  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>Potencia 100% (900) Sin portas</li> <li>Potencia 100% (900) Con portas</li> <li>Apagado</li> </ul> | 3 min<br>5' (agregar agua destilada a RT)<br>3' (agregar agua destilada a RT) + 3'<br>20 min |
| PBS   | 10 min   |
| <b>Bloqueo de la actividad de peroxidasa endógena</b>   |  |
| 4 ml de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30 volúmenes) + 36 ml de metanol   | 15 min   |
| PBS   | 15 min   |
| <b>Bloqueo de uniones inespecíficas</b>   |  |
| Normal Goat Serum (NGS) –PBS leche 1/20   | 30 min (en cámara húmeda) a RT   |
| <b>Anticuerpo Primario</b>  |  |
| Incubación con anticuerpo específico  | 14-16 hs a 4°C (en cámara húmeda)  |
| PBS   | 15 min   |
| <b>Sistema de Revelado</b>  |  |
| Anticuerpo Secundario Biotinilado   | 30 min (en cámara húmeda) a RT   |
| PBS   | 5 min  |
| Extravidina-Peroxidasa  | 30 min (en cámara húmeda) a RT   |
| PBS   | 5min   |
| Sustrato enzimático (5 µl de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30 vol) + cromógeno (2,3 mg DAB) disueltos en 3,3 ml Tris-HCl 0,05 M (pH 7,5)  | 6 -10 min  |
| Agua destilada  | 5 min  |
| <b>Contra-coloración y Deshidratación</b>   |  |
| Hematoxilina de Mayer   | 1 min  |
| H <sub>2</sub> O de la canilla  | 1 min  |
| Agua amoniacal  | 15 seg   |
| H <sub>2</sub> O de la canilla  | 3 min  |
| Alcohol 70°, 96°, 100° I y 100° II  | 1 min c/u  |
| Xilol 1 y Xilol 2   | 2 min y 5 min  |
| <b>Montaje con medio de montaje permanente (Eukitt, Sigma, Aldrich)</b>   |  |

La apoptosis se evaluó mediante el método TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labelling). Utilizando el kit de detección de muerte celular *in situ*, POD (Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, Alemania) [111]. El método se basa en la capacidad de la desoxinucleotidil-transferasa para marcar los extremos romos de las rupturas de ADN de doble cadena, que se observan dada la fragmentación del mismo, durante las últimas etapas de la apoptosis [136]. Se identificaron células apoptóticas usando el sustrato cromogénico DAB. Las muestras de complejo GAM embrionario, se contracoloraron con hematoxilina de Mayer. Los resultados se expresaron como porcentaje del área positiva.

#### **- Inmunofluorescencia:**

Se realizó una inmunofluorescencia doble para evaluar la co-localización de VASA/p63 en las gónadas embrionarias. Secciones transversales de complejo GAM, fueron desparafinadas, rehidratadas y sometidas a microondas para la recuperación antigénica. Para reducir la autofluorescencia, las secciones se bloquearon con borohidruro sódico durante 40 minutos y con suero normal de cabra (Sigma) durante 1 h. La incubación con anticuerpos primarios (descritos en la Tabla 1) se realizó durante la noche a 4°C. Los anticuerpos secundarios se incubaron durante 1 h, y a continuación, los vidrios se lavaron en tres cambios de PBS durante un total de 45 min. Se utilizaron los siguientes anticuerpos secundarios: Alexa Fluor 488 cabra anti-conejo (para VASA, fluorescencia verde, dilución 1: 100, Invitrogen Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.) y Alexa Fluor 546 cabra anti-ratón (para p63, fluorescencia roja, Dilución 1:100, Invitrogen Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.). A continuación, se incubaron todas las muestras con dihidrocloruro de 4 '6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, dilución 1: 1000, Fluka, Sigma-Aldrich) durante 5 min y se almacenaron en la oscuridad a temperatura ambiente. Por último, las secciones se montaron en Prolong Gold (Fluorescent mountant - Invitrogen). Los controles negativos incluyeron secciones de GAM incubadas usando solución de tampón de anticuerpo primario (BSA al 3%, Tween 20 al 0,1% en PBS) en lugar del anticuerpo primario para controlar la tinción inespecífica. Todas las secciones inmunoteñidas se examinaron utilizando un microscopio Olympus BX-51 equipado para la detección de epifluorescencia con los filtros apropiados (Olympus). Las imágenes fueron grabadas usando una cámara digital de alta resolución de color USB 2.0 (QImaging Go-3, QImaging, Surrey, Columbia Británica, Canadá).



#### 4.3.2. Extracción de material genético gonadal, separado del complejo GAM mediante la técnica de micropunción de Palkovitz.

La técnica de micropunción de Palkovitz [132] permite extraer el material genético a partir de muestras guardadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  en tacos de OCT, medio sintético líquido a temperatura ambiente que se solidifica en frío y permite el corte histológico a temperaturas bajo cero. En micrótopo de tipo criostático se realizaron cortes de  $300\text{ }\mu\text{m}$  de espesor en los cuales se pudo identificar y aislar la gónada del complejo GAM mediante sacabocados de diámetro interno  $0,5\text{ mm}$  y  $1\text{ mm}$ .

Los fragmentos de gónada aislados fueron unificados para cada embrión y homogeneizados en reactivo Trizol® para extraer ARN total, siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen Argentina, Buenos Aires, Argentina), cada muestra (considerada como la suma de fragmentos de gónada aislados de cada embrión), se procesó individualmente. La concentración y la pureza de ARN total se determinó mediante la medición de la absorbancia al UV a  $260$  y  $280\text{ nm}$  con el espectrofotómetro Thermo Scientific™ NanoDrop Lite. Solamente aquellas muestras con un cociente  $A_{260}/A_{280}$  mayor a  $1,8$  se almacenaron en freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

Cantidades equivalentes de ARN ( $0,5\text{ }\mu\text{g}$ ) fueron retro-transcriptas a ADN copia (ADNc) con transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney ( $200\text{ U}$ ; Promega, Madison, WI) usando  $200\text{ pmoles}$  de hexanucleótidos al azar (Promega). Veinte unidades de inhibidor de ribonucleasas (RNAout; Invitrogen) y  $100\text{ nmoles}$  de una mezcla de los cuatro trifosfatos de desoxinucleótidos (dNTPs) fueron agregados a cada tubo de reacción en un volumen final de  $30\text{ }\mu\text{l}$  de buffer de transcriptasa reversa  $1\times$ . La transcripción reversa se realizó a  $42^{\circ}\text{C}$  durante  $90\text{ min}$  y la reacción fue finalizada mediante calentamiento a  $97^{\circ}\text{C}$  durante  $5\text{ min}$  y posterior enfriamiento en hielo. El ADNc obtenido se llevó a un volumen final de  $60\text{ }\mu\text{l}$  con agua libre de ribonucleasas y fue guardado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , hasta el momento de realizar las PCR en tiempo real.

Se utilizó un protocolo optimizado de la técnica de PCR en tiempo real para analizar los niveles de expresión relativa del ARNm de los genes implicados en la determinación sexual y en la diferenciación gonadal: *amh*, *sox9*, *sfl*, *aromatasa*. Como control interno de carga (*housekeeping gene*) se determinó la expresión del gen que codifica para la proteína ribosomal L8. En la tabla 4 se detallan los oligonucleótidos cebadores utilizados para este estudio, diseñados mediante el uso de secuencias para *A. mississippiensis*.

Todas las muestras retrotranscriptas a ADNc fueron amplificadas por triplicado. Los niveles de ADNc fueron detectados utilizando el sistema *Real-Time DNA Step One Cyclor* (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA). Para la amplificación,  $5\text{ }\mu\text{l}$  de ADNc se combinaron con una pre-mezcla comercial *HOT FIREPol -EvaGreen -qPCR Mix Plus* (Solis BioDyne;

Biocientífica, Rosario, Argentina) y 10 pmol de cada cebador (Invitrogen, Carlsbad, CA), en un volumen final de 20 µl. Luego de la desnaturalización inicial a 95°C durante 15 min, la mezcla de reacción fue sometida a ciclos sucesivos de desnaturalización a 96°C durante 15 s, hibridación a 52-60 °C durante 15 s, y extensión a 72°C durante 15 s. La pureza del producto se confirmó por curvas de disociación (*melting curve*) y electroforesis en gel de agarosa utilizando el colorante GelRed™ (Biotium ®, Hayward, CA). Controles sin ADNc fueron incluidos en todos los ensayos, los cuales no produjeron amplificación consistente. El ciclo umbral (Ct) de cada muestra fue calculado utilizando el programa de análisis *Step One Software* (Applied Biosystems Inc. Foster City, CA, USA). La eficiencia de las reacciones de PCR se evaluó para cada par de cebadores por la amplificación de ocho diluciones en serie de los ADNc y posterior construcción de la recta Ct vs. log de la dilución (eficiencia =  $10^{(-1/\text{pendiente})} - 1$ ). Dependiendo de las condiciones específicas de PCR, la eficiencia varió de 98% a 102%. No se observaron diferencias significativas en los valores de Ct del gen de expresión constitutiva de L8 entre los grupos experimentales.

Los niveles de expresión de las muestras experimentales sobre los valores controles se calcularon para cada gen *target* utilizando el método de la curva estándar relativa [137]. Para cada uno de los genes *target* y para el gen de referencia se construyó una curva estándar relativa (curva de calibrado) Ct vs. Log C<sub>R</sub> (donde C<sub>R</sub> es Concentración Relativa). Para todas las muestras experimentales, la cantidad relativa del gen de interés del gen de referencia fue determinada de la curva realizada. La cantidad obtenida correspondiente al gen *target* fue normalizada contra la cantidad relativa del gen de referencia en cada uno de los grupos experimentales.

#### **4.4. Generación de un anticuerpo policlonal anti-aromatasa.**

##### **4.4.1. Diseño bioinformático, amplificación, clonado de la secuencia nucleotídica necesaria para la expresión del antígeno de Aromatasa.**

Mediante el estudio taxonómico, usando la herramienta *Taxonomy Browser* del portal informático del National Center for Biotechnology Information, se evaluó en primera instancia, la secuencia aminoacídica de aromatasa disponible, más cercana a *C. latirostris* desde el punto de vista filogenético. De esta manera se decidió trabajar con la secuencia reportada para aromatasa de *Alligator Mississippiensis*.

La región de la secuencia del gen de aromatasa que fue utilizado para generar el antígeno se seleccionó utilizando la herramienta BioPlot del programa bioinformático Vector NTI, capaz de identificar zonas proteicas con alta antigenicidad teórica. Para la producción del antígeno, se

utilizó una estrategia de clonado direccionada, amplificando por PCR las secuencias nucleotídicas de las regiones antigénicas seleccionadas. El antígeno de aromatasa incluyó la región correspondiente a los aminoácidos 591 a 875 de la secuencia para *Alligator mississippiensis* (alligator americano) (número de acceso AY029233.1). Para las amplificaciones por PCR, se empleó ADNc obtenido de una muestra de complejo GAM de *C. latirostris* y se utilizaron oligonucleótidos diseñados específicamente con el agregado de sitios de corte para enzimas de restricción (XhoI: CTCGAG, EcoRI: GAATTC) que se detallan en la tabla 5.

**Tabla 4:** Cebadores utilizados para el estudio de expresión de genes implicados en la determinación sexual y en la diferenciación gonadal a nivel de ARNm, mediante PCR en tiempo real.

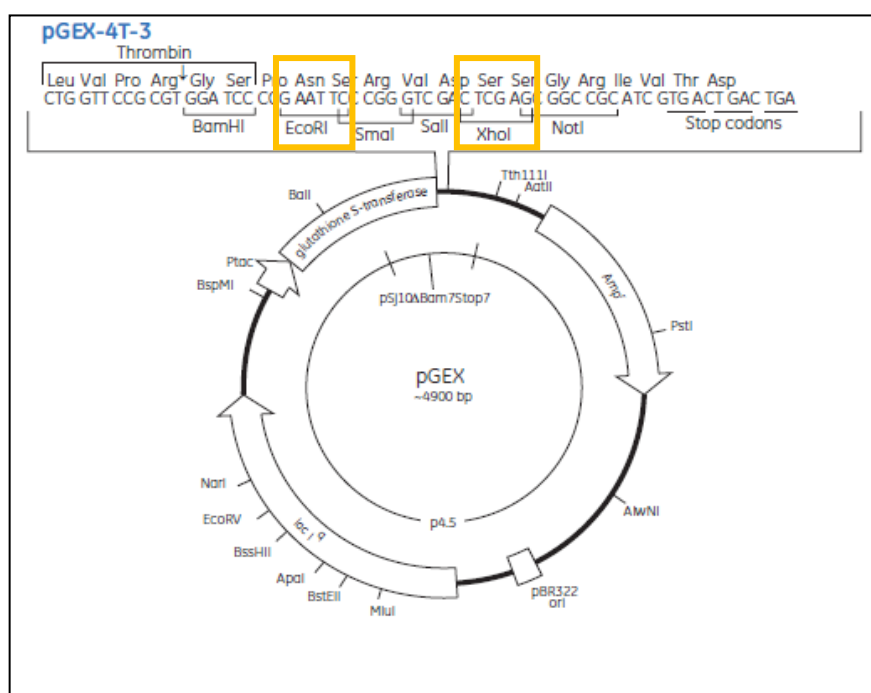
| Gen     | Acceso<br>GenBank | Cebador Sentido<br>5'-3' | Cebador Anti-sentido<br>5'-3' | Tamaño<br>(pb) |
|---------|-------------------|--------------------------|-------------------------------|----------------|
| amh     | AF180294          | TCCACCCGTGCCGACTACTA     | CAGAGTATTGGACGGGCACG          | 106            |
| Sox-9   | AF106572          | GGCTCGGAGCAAACCCACAT     | TGCCAGGCTGGACGTCTGTT          | 172            |
| Sf-1    | AF180296          | GGCTCCATCCTGAACAACCT     | TTGAGGCAGACGAACTCCTG          | 95             |
| Cyp19a1 | AY029233.1        | CTGGAGATGATGATCGCTGC     | TGGCATGTTCATCGCTCTGTA         | 152            |
| L8      | ES316580.1        | CACGACCAGCCTTTAAGATA     | CTCACAATCCTGAAACCAAG          | 141            |

El producto de PCR obtenido, se purificó a partir de un gel de agarosa utilizando el kit Wizard SV Gel and Clean-Up System (Promega) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Luego, cada producto de PCR se digirió con las enzimas EcoRI y XhoI en Buffer H (Promega) durante 2 h a 37°C. Los productos de los cortes de restricción fueron purificados y ligados al vector pGEX-4-T3 (Fig.2, Stragene Corp., La Jolla, CA) digerido con las mismas enzimas, durante toda la noche a 4°C utilizando la enzima T4 ADN ligasa (Promega). Así, se logró el clonado direccional en el vector de expresión recombinante pGEX-4T-3/arom. (Figura 8).

**Tabla 5:** Cebadores utilizados para amplificar y clonar las secuencias de aromatasa para *C. latirostris*.

| Gen                  | Aromatasa  |
|----------------------|--|
| Tamaño (pb)          | 296  |
| Cebador Sentido      | 5'- tggg <b>GAATTC</b> G CCTGGTCTTGTACGTATGATA -3' |
| Cebador Anti-sentido | 5'- tggg <b>CTCGAG</b> TCCTCATATTTCTTGTACAG -3'    |

\* En minúsculas se muestran los extremos 5' no específicos de los oligonucleótidos. En negrita se resalta la secuencia de corte de las enzimas EcoRI y XhoI (Promega) utilizadas para el clonado direccional en el vector de expresión pGEX4T-3.



**Figura 8:** Plásmido pGEX-4T-3 y estrategia de clonado utilizada para la expresión del antígeno de aromatasa como una proteína de fusión con glutatión-S-transferasa (GST-aromatasa). Tomado y modificado de GE Healthcare Life Sciences 2014.

De esta forma, el marco de lectura de aromatasa queda en fase con el de la Glutathione-S-transferasa (GST, Figura 8). Así, el constructo pGEX-4T-3/arom, dirige la síntesis de la proteína de fusión GST-aromatasa. Con los plásmidos recombinantes obtenidos se transformaron bacterias *Escherichia coli* (*E. coli*) *DH5α* (Stratagene) por el método de  $\text{CaCl}_2$ . Se seleccionaron clones de bacterias transformadas al azar y se chequeó por PCR que efectivamente habían sido transformadas con el vector recombinante. Se generaron stocks de esas bacterias y se almacenaron a  $-80^\circ\text{C}$ .

#### 4.4.2. Expresión y purificación del antígeno recombinante.

Para expresar en forma soluble las proteínas recombinantes, células de *E. coli JM109* (Stratagene) fueron transformadas con el vector pGEX-4T-3/aromatasa y cultivadas en medio Luria Bertoni (1% peptona de carne, 0,5% extracto de levadura, 1% NaCl). La expresión de las proteínas de fusión se indujo con el agregado de Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG, Promega) en una concentración final de 250 nM. Luego de la inducción, el cultivo de células fue sonificado en baño de hielo (High Intensity Ultrasonic Processor, Vibra-Cell, Sonics and Materials Inc. Newton, CT, USA) y centrifugado a 14.000 rpm durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante fue recuperado y la proteína de fusión fue purificada a partir del mismo utilizando una columna cromatográfica GSTrap<sup>TM</sup> (GE Healthcare, Buenos Aires, Argentina). Se recogieron las fracciones de elución, cuya concentración de proteína se estimó determinando la absorbancia a 280 nm. Las fracciones obtenidas fueron sembradas y corridas en un gel de poliacrilamida del 5 al 20 % para evaluar su pureza relativa. Se juntaron todas las fracciones contenían proteína y se las concentró utilizando tubos de filtración forzada (Centricon, límite de paso 10 KDa, Milipo, Billerica, MA).

#### 4.4.3. Obtención, purificación y caracterización del anticuerpo policlonal mono específico de conejo.

**a) Inoculación de los conejos:** una vez obtenida la proteína de fusión purificada (GST-Aromatasa) se procedió a la inoculación de dos conejos, de acuerdo al siguiente protocolo (Harlow y Lane 2014; Vaitukaitis y col., 1971):

- Se tomó una muestra de sangre de la cual se obtuvo el suero basal y luego se inoculó el antígeno.

- Se inyectó por vía subcutánea una preparación de 300  $\mu$ l del antígeno en una concentración de 1  $\mu$ g/ $\mu$ l disuelto en PBS con 300  $\mu$ l de adyuvante completo de Freund,

- 15 días después se realizó una inoculación de la misma preparación antes descripta, pero esta vez, se utilizó adyuvante incompleto de Freund. Este procedimiento se repitió dos veces cada 15 días, finalizado el proceso de inoculación a los 60 días de la primera inoculación. Dos semanas luego del último estímulo, los conejos fueron sacrificados y exanginados, almacenándose los sueros a -20°C.

**b) Purificación de los anticuerpos específicos:** Se realizó mediante dos cromatografías de afinidad sucesivas, utilizando columnas cuya matriz se componía de agarosa unida a radicales N-hidroxisuccinamida (NHS) activados (GSTrap FF, GE healthcare). Estas columnas permiten adherir a la matriz activada, antígenos específicos de los anticuerpos que se desean aislar. En la primera cromatografía, nos hemos propuesto separar del antisuero, los anticuerpos

que pudiesen haberse generado contra el péptido de GST (que formaba parte de los antígenos recombinantes inoculados a los conejos). Para ello se adhirió a la columna cromatográfica el péptido de GST obtenido a partir de la expresión en células *E. coli JM109* transformadas con el plásmido pGEX-4T-3, es decir, sin ninguna proteína fusionada a GST. Para ello, 5 mg de proteína GST purificada, se concentraron con tubos Centricon (Milipore) a un volumen final de 1 ml. Esta solución se adicionó a la columna de 1 ml de lecho activado y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se desactivaron los grupos NHS activos remanentes y la columna se lavó con PBS, luego con solución de elución (glicina 100 mM pH 3) y finalmente, se equilibró con PBS. Una vez preparada la columna se sembró el antisuero y se lavó con PBS. En esta columna quedan retenidos los anticuerpos contra GST, pasando al percolado la fracción de antisuero que contiene los anticuerpos específicos contra aromatasa. De esta manera, el percolado se conserva hasta la siguiente cromatografía. La columna luego se eluye con buffer de elución, y se descarta el eluato que contiene los anticuerpos contra GST.

En la segunda cromatografía nos propusimos purificar los anticuerpos específicos contra la proteína de interés, descartando otros anticuerpos o moléculas contaminantes del antisuero. Por lo tanto, para estas cromatografías se emplearon las mismas columnas GSTrap FF, pero adicionando a la columna de 1 ml de lecho activado, 5-7 mg de proteína recombinante GST-Aromatasa purificada y concentrada. En este caso el percolado se descartó y los anticuerpos de interés retenidos en la columna se eluyeron y se recogieron fracciones de 1 ml con 60 µl de Tris-HCl 1,5 M pH 8,6 para neutralizar el eluido. Luego se leyó la absorbancia de cada fracción en espectrofotómetro a 280 nm. Las fracciones con absorbancias mayores a 0,2 se juntaron, homogeneizaron y posteriormente se concentraron con tubos Centricon (límite de paso 30 KDa, Milipore) y se almacenaron a -20°C hasta ser utilizadas para los inmunoensayos.

#### **c) Caracterización de los anticuerpos generados por IHQ:**

Para las pruebas de validación de especificidad, el péptido antigénico se usó para pre-absorber el anticuerpo de aromatasa incubando 1 µg del anticuerpo con 10-20 µg del péptido antigénico durante 24 h a 4°C. El anticuerpo de aromatasa se ensayó mediante IHQ en secciones de ovarios control de *C. latirostris* neonatal. La expresión de la aromatasa en las gónadas embrionarias se cuantificó mediante análisis de imagen en las gónadas. Los resultados se expresaron como porcentaje del área positiva.

#### **4.5. Análisis estadístico**

Los resultados fueron sometidos a test de normalidad y homogeneidad de varianzas (Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente). Se utilizaron test paramétricos para aquellas variables con

distribución normal: test de varianza múltiple (ANOVA) para determinar diferencias estadísticas entre estadios de desarrollo y test t de student de dos colas para determinar diferencias estadísticas entre los grupos de tratamiento. Cuando los datos no cumplieron los supuestos de normalidad, los análisis estadísticos se realizaron utilizando la prueba U de Mann-Whitney y el análisis de varianza unidireccional de Kruskal-Wallis seguido por Dunn como post-test (Siegel, 1956). Los datos se informaron como la media  $\pm$  SEM. En todos los casos, las diferencias se consideraron significativas con  $p < 0,05$ . Para todos los análisis, se utilizó el software IBM SPSS Statistics 19 (IBM Inc.).

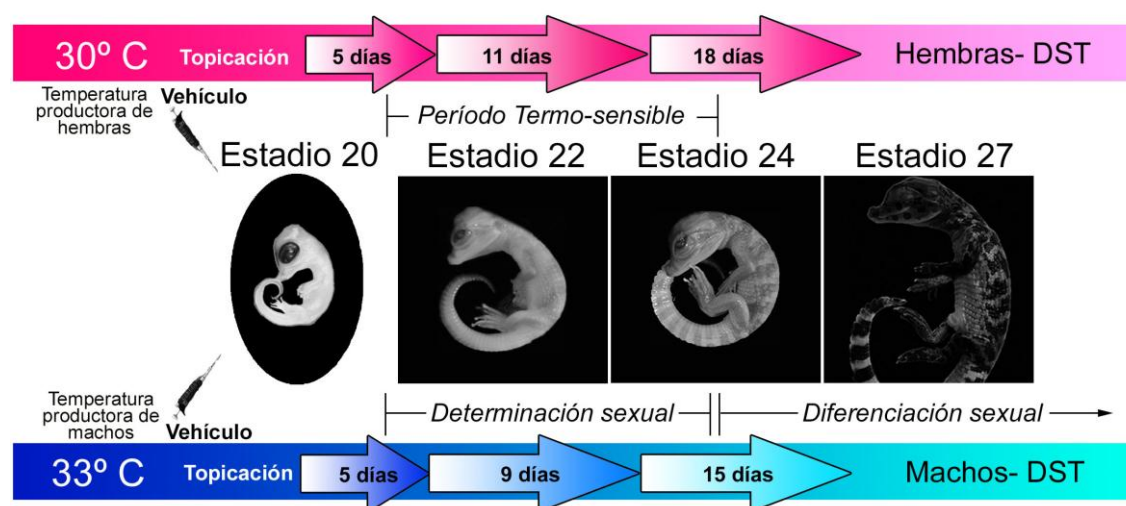
## **5. RESULTADOS**



### 5.1 Caracterización de la Determinación Sexual por Temperatura (DST)

#### 5.1.1. Obtención de embriones de *Caiman latirostris* en estadios 22, 24 y 27 de desarrollo.

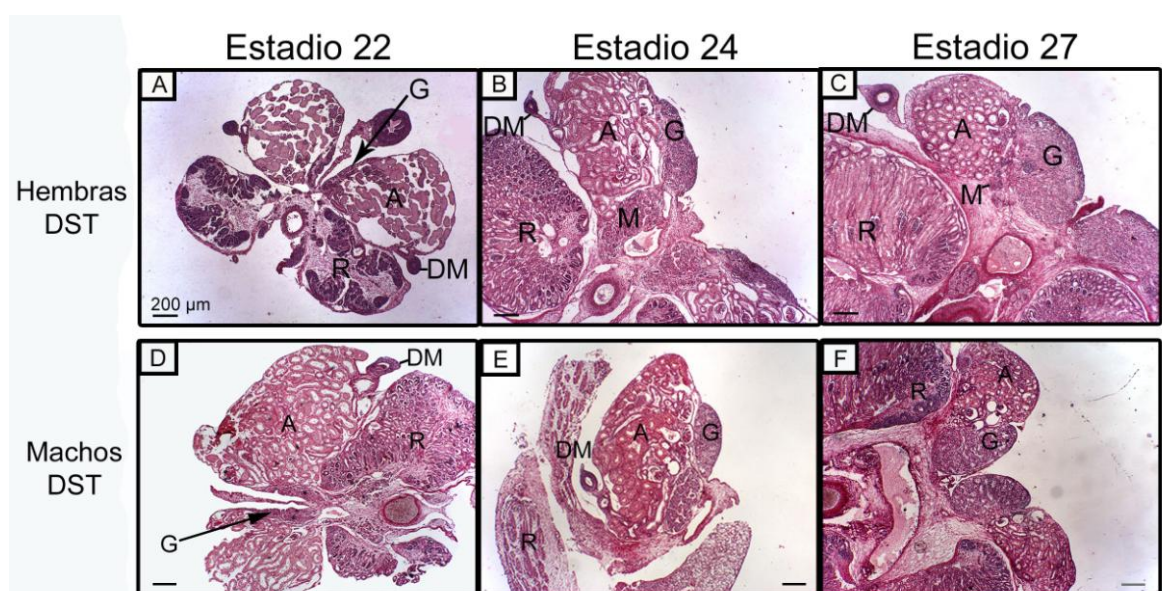
Como hemos demostrado anteriormente [9], el crecimiento embrionario es más acelerado por incubación a 33°C que a 30°C. El período de incubación total de *C. latirostris* es de aproximadamente 76 días a 30°C, mientras que a 33°C es de aproximadamente 67 días. La sincronía del desarrollo embrionario debido a la temperatura comienza justo después de la etapa 22. Los embriones en la etapa 22 se obtuvieron al quinto día después de la etapa 20 (la etapa en la que se realizaron los tratamientos) a ambas temperaturas de incubación. Los embriones en la etapa 24 se obtuvieron 9 días después de la etapa 22 a 33°C y 11 días después a 30°C. Los embriones en la etapa 27 se obtuvieron 15 días después de la etapa 24 a 33°C y 18 días después a 30°C (Fig. 9).



**Figura 9:** Esquema que muestra la secuencia de los principales acontecimientos en el desarrollo de las gónadas embrionarias de *C. Latirostris*. Las hembras se obtuvieron a 30°C - temperatura de producción femenina y los machos a 33°C - temperatura de producción masculina. Las flechas muestran el tiempo en días necesarios para pasar a la siguiente etapa que difiere entre las temperaturas de incubación. Los tratamientos (en este caso es sólo vehículo, porque se estudia la DST) se aplicaron en el estadio 20, previo al período termo-sensible. Las etapas estudiadas fueron elegidas considerando los períodos de determinación del sexo (E21 a E24) y diferenciación gonadal (E24 a post-eclosión).

### 5.1.2. Localización anatómica y cambios histo-morfológicos durante el desarrollo de las gónadas.

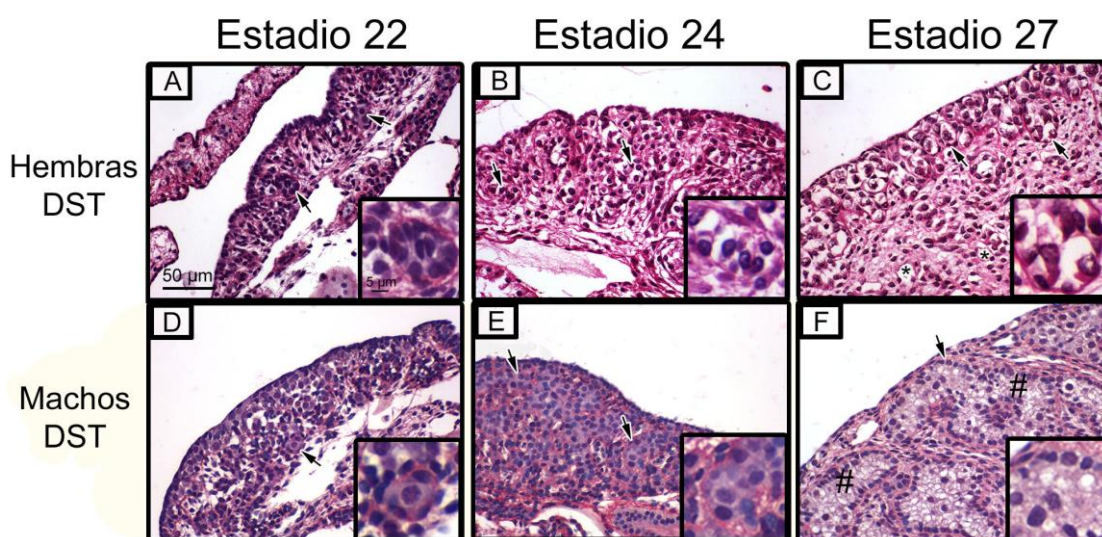
Se identificaron gónadas embrionarias en todos los estadios estudiados (22, 24 y 27). Las gónadas son estructuras localizadas en la cavidad abdominal media-baja, dispuesta simétricamente como una imagen especular en el complejo GAM. Los conductos de Müller fueron útiles para localizarlos, ya que yacen dorso lateralmente a ambos lados del complejo GAM. Las gónadas aumentan en tamaño y diferenciación conforme avanza el desarrollo del embrión (Fig.10). En la etapa 22, los complejos GAM se componen de estructuras pareadas situadas ventralmente asociadas con los riñones que están en posición dorsal (Fig.10A, D). Frente a los complejos GAM está la cloaca. Los conductos de Müller se encuentran dorso lateralmente en ambos lados. El complejo GAM se compone de la gónada primordial de pequeñas dimensiones situada en posición ventral unida a la glándula suprarrenal y al mesonefros. Este último puede o no observarse en secciones transversales dependiendo de la profundidad del corte histológico, entre la gónada y la suprarrenal. En esta etapa los primordios gonádicos se enfrentan y se encuentran muy próximos. En etapas posteriores las estructuras aumentan de tamaño y empiezan a separarse unas de otras (Fig. 10B, E, C, F). Finalmente, puede observarse la distinción anatómica entre machos y hembras DST en estadio 27 de desarrollo embrionario, donde hay ausencia del ducto de Müller en los machos DST. (Fig. 10F)



**Figura 10:** Fotomicrografías de bajos aumentos representativas de los complejos GAM (Gonad-Adrenal-Mesonephros) de hembras de *Caiman latirostris* incubadas a 30° C - temperatura de producción femenina en A) estadio 22, B) estadio 24 y C) estadio 27 de desarrollo embrionario; y machos incubadas a 33° C - temperatura de producción masculina en D) estadio 22, E) estadio 24 y F) estadio 27 de desarrollo embrionario. Las imágenes muestran el crecimiento progresivo en tamaño y diferenciación. Gónada (G),

suprarrenal (A), ducto Mülleriano (DM), mesonefros (M) y riñón (R). Secciones de tejido transversales teñidas con la solución tricrómica de Picrosirius y contrastadas con hematoxilina Harris.

Histológicamente en la etapa 22, la gónada en ambas condiciones de incubación (TPM ó TPH) comprende un epitelio germinal externo y cordones medulares subyacentes. En las secciones transversales, la gónada está compuesta por una corteza definida y la médula (Fig. 11A y D). En la corteza, las células germinales primordiales grandes, con citoplasma débilmente teñido (células VASA positivas), se distribuyen dentro de un epitelio pseudoestratificado a estratificado de células epiteliales columnares. Las células germinales se observan ocasionalmente en la médula, solas o formando nidos. La inmunomarcación con anticuerpos anti-VASA constituye una herramienta útil para confirmar la identidad de las células germinales en esta etapa del desarrollo temprano. La médula contiene cordones celulares poco organizados, separados por células mesenquimales oscuras. Los espacios vacíos que se ven en la médula, podrían ser el primer signo de la diferenciación de la gónada femenina. A pesar de ello, no hay signos consistentes de diferenciación sexual gonadal en la etapa 22 a 30°C ni a 33°C (Fig. 11A y D). Las gónadas de embriones hembra en la etapa 24 obtenidas por incubación a 30°C (DST) no difieren de las obtenidas por incubación a 33°C (machos DST). El estadio 27 en las hembras DST se caracteriza por un aumento en el número de células germinales agrupadas en conglomerados y una mayor delimitación de los cúmulos por las células estromales. La médula aparece en mayor regresión y las lagunas típicas comienzan a ser observadas (Fig. 11C). Los machos DST en estadio 27, muestran túbulos seminíferos de alto grado de desarrollo, difiriendo ampliamente de la gónada de la hembra en esta etapa (Fig. 11F).



**Figura 11:** Fotomicrografías representativas que muestran las gónadas en diferentes estadios de desarrollo (E22, E24 y E27), y en dos condiciones de incubación (a 30°C TPH y 33°C TPM) Las flechas muestran un grupo de células germinales. El recuadro muestra una mayor ampliación de esos nidos. Los

asteriscos muestran cavidades irregulares que dan lugar a las lagunas. Los signos numerales muestran los túbulos seminíferos en alto grado de desarrollo. Los cambios se observan en las diferentes condiciones de incubación (30°C y 33°C) en la etapa 27. Secciones transversales de tejido gonadal teñidas con la solución tricrómica de Picrosirius y contrastadas con hematoxilina Harris.

### 5.1.3. Expresión de los receptores hormonales

Se evaluó por IHQ si la expresión de ER $\alpha$  y PR difiere entre las hembras DST y los machos DST. En el caso del ER $\alpha$ , se detectó como una proteína nuclear en las gónadas embrionarias. Su expresión no se modificó a lo largo de las etapas de desarrollo evaluadas en las hembras DST. Mientras que en los machos se observó un aumento durante el PTS, cayendo hacia el final del desarrollo, en la etapa 27 ( $p=0,0302$ ). Los machos mostraron una mayor expresión de ER $\alpha$  en las etapas 22 y 24 ( $p=0,0286$ ;  $p=0,0423$ ), mientras que en la etapa 27, la expresión fue menor en este grupo que las hembras DST ( $p < 0,05$ ) (Fig. 12 A-F)

Al igual que ER $\alpha$ , el PR mostró un patrón nuclear en las gónadas embrionarias (Fig. 12 G-L). La expresión de PR en las hembras DST, si bien fue baja durante las etapas de desarrollo estudiadas, en el estadio 22, fue mayor que el grupo incubado a temperatura para machos. Sin observarse diferencias entre ambos grupos en los estadios 24 y 27. A lo largo del desarrollo, las hembras no mostraron un cambio de expresión de este receptor, mientras que en los machos, la expresión de PR aumentó significativamente hacia el final del desarrollo embrionario ( $p=0,0082$ ) (Fig. 12).

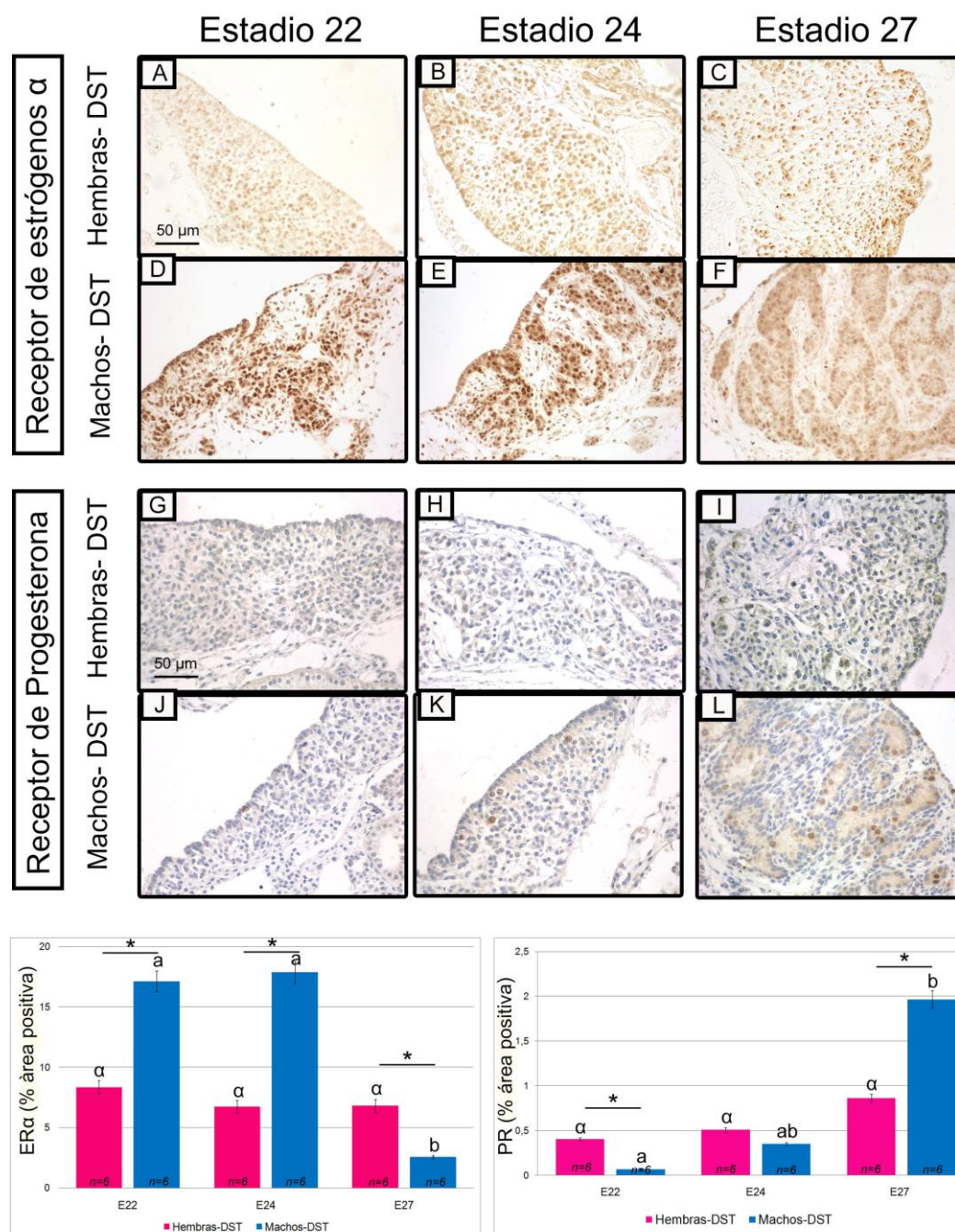
### 5.1.4. Desarrollo del anticuerpo policlonal para la detección de Aromatasa por IHQ.

Teniendo en cuenta el rol fundamental de la enzima citocromo P450-aromatasa, responsable de la conversión de los andrógenos en estrógenos. Ésta como tal, desempeña un papel clave en muchas funciones biológicas que dependen de los estrógenos, incluyendo la diferenciación sexual durante el desarrollo embrionario de vertebrados. Por esto, nos propusimos estudiar la expresión de esta enzima en las gónadas embrionarias de *C. latirostris*.

#### 5.1.4.1. Diseño y obtención de antígenos específicos

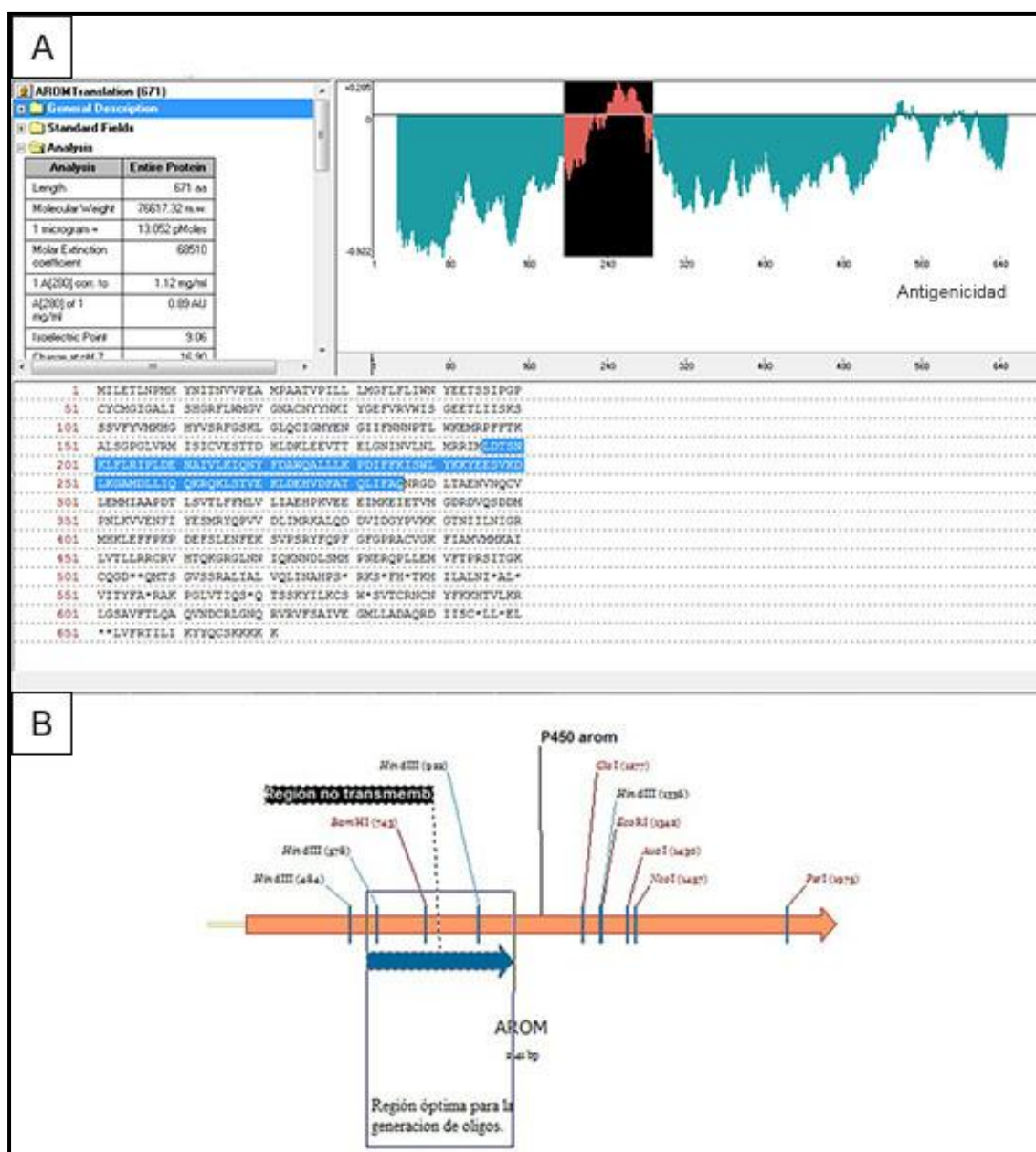
Mediante el estudio bioinformático de dicha secuencia, se detectó una región de alta antigenicidad teórica (Fig. 13A). Teniendo en cuenta esta región, se seleccionó en la secuencia nucleotídica correspondiente, el fragmento a ser amplificado por PCR para generar los antígenos. Dicho fragmento abarcó la región comprendida entre los aminoácidos 196 - 286 de la secuencia de aromatasa de *A. mississippiensis* (nro. acceso Genbank: AY029233.1). (Fig. 13B).





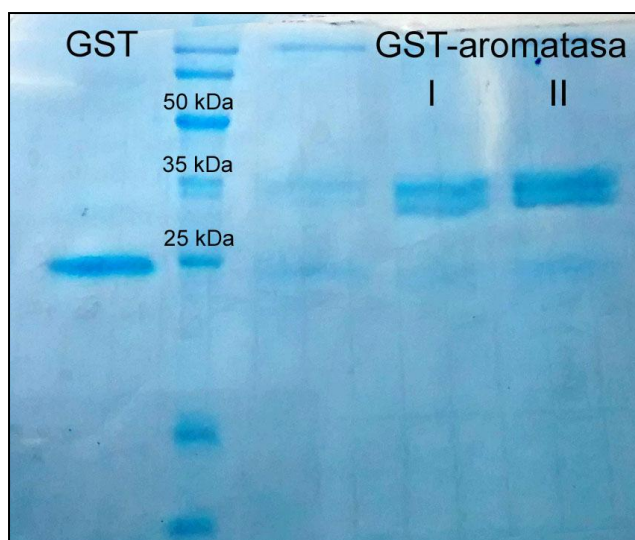
**Figura 12:** Expresión de los receptores de hormonas esteroideas sexuales en las gónadas embrionarias de *C. latirostris*. Cortes histológicos que muestran el patrón de inmunomarcación de ER $\alpha$  y PR en diferentes estadios embrionarios de desarrollo y las condiciones de incubación a temperatura productora de hembras (TPH - 30°C) frente a temperatura productora de machos (TPM - 33°C). La expresión de ER $\alpha$  en hembras DST en las etapas 22, 24 y 27 (A-C). La expresión de ER $\alpha$  en machos DST en las etapas 22, 24 y 27 (D-F). Expresión de PR en hembras DST en las etapas 22, 24 y 27 (G-I). Expresión de PR en machos DST en las etapas 22, 24 y 27 (J-L). Panel inferior: Expresiones de ER $\alpha$  y PR cuantificadas como porcentaje del área positiva. Los valores representan la media  $\pm$  SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas a  $p < 0,05$  por la prueba U de Mann-Whitney (comparando cada estadio en las condiciones de tratamiento de DST frente a DSE<sub>2</sub>) o Kruskal-Wallis seguido de la prueba de Dunn (comparando cada condición de

tratamiento a lo largo de las tres etapas estudiadas) En este caso con letras griegas para la condición hembras DST y letras latinas para machos DST. Muestras por grupo tratamiento  $n=6$ .



**Figura 13:** Selección del fragmento de la secuencia de aromatasa, para ser utilizado como antígeno en la producción de un anticuerpo policlonal específico para *C. latirostris*. **A:** Análisis de la antigenicidad teórica de la proteína aromatasa. En rojo y negro se muestra la antigenicidad correspondiente al polipéptido codificado por la secuencia seleccionada. **B:** Salida del programa informático Vector NTI. Se observa la secuencia codificante completa del gen de aromatasa de *Alligator Mississippiensis*. La flecha naranja representa el único exón. La flecha azul muestra la región de la secuencia óptima para generar el antígeno por PCR.

Siguiendo la estrategia de clonado direccional detallada en la sección 3.4 de MyM, se obtuvo el plásmido recombinante pGEX-4T-3/Arom, el cual fue expresado en bacterias *E. coli* JM109 y la proteína de fusión GST-Aromatasa resultante fue purificada mediante una columna cromatográfica GSTrap™. Las fracciones obtenidas durante la elución se separaron mediante SDS-PAGE y el gel fue teñido con Coomassie Blue (Fig. 14).

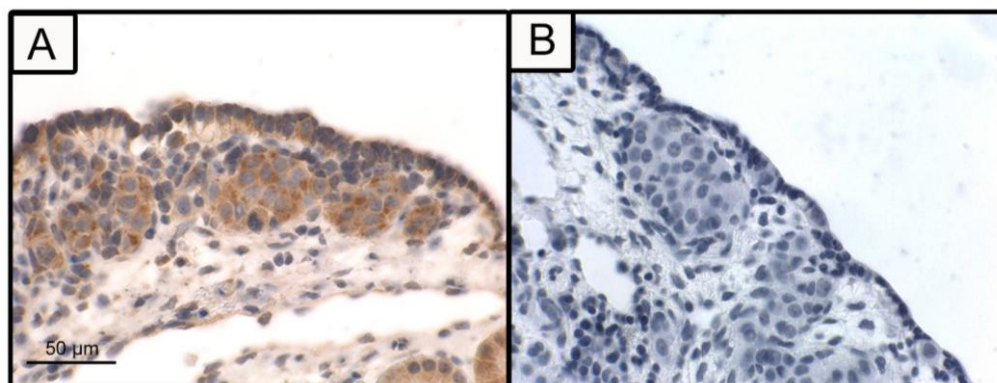


**Figura 14:** Purificación del antígeno GST-Aromatasa mediante cromatografía de afinidad. Gel de poliacrilamida teñido con Coomassie Blue. Se observan fracciones de una cromatografía realizada con GSTrap. De izquierda a derecha: GST purificada, marcador de peso molecular, eluatos de GST-aromatasa purificados (I y II).

En la figura 14 se puede observar que la proteína recombinante purificada está compuesta por dos péptidos, uno mayoritario con respecto al otro. De acuerdo al peso molecular de las mismas, la banda de menor peso molecular correspondería a la proteína GST, mientras que la banda más cuantiosa sería GST-aromatasa (aproximadamente 35 kDa). Nótese que la aparente división de esta banda también se observa en la calle del marcador de peso molecular, siendo esto, un efecto propio de la electroforesis.

#### 5.1.4.2. Caracterización del anticuerpo generado, por IHQ

La enzima se encontró en el citoplasma de los ovocitos en las muestras control (Fig. 15A). Para validar la especificidad de la marcación, la combinación de complejos anticuerpo-antígeno (anticuerpos pre-adsorbidos) se aplicó sobre las muestras de control en ensayos inmunohistoquímicos. En estas muestras no hubo tinción (Figura 15B), lo que valida el ensayo.

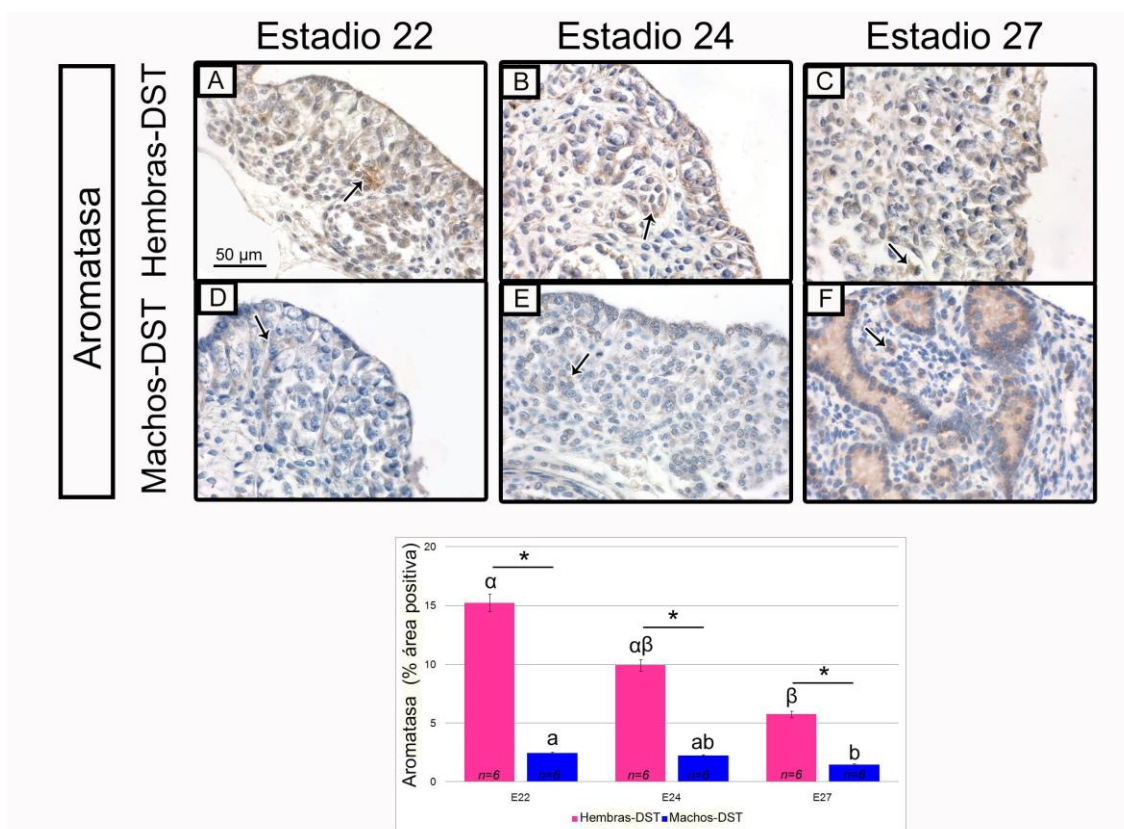


**Figura 15:** Caracterización del anticuerpo anti-aromatasa por IHQ. Fotomicrografías representativas que muestran la distribución de la aromatasa en las gónadas control de *C. latirostris* utilizando el anticuerpo policlonal generado en nuestro laboratorio. A: La inmunoreactividad se observó como un patrón citoplasmático punteado compatible con una proteína localizada mitocondrial en el citoplasma de los ovocitos. B: ausencia de tinción específica cuando los anticuerpos se pre-incubaron con el péptido correspondiente utilizado como inmunógeno. La IHQ se reveló con DAB y se contrastó con hematoxilina de Mayers.

#### 5.1.5. Expresión de aromatasa

Se detectó inmunoreactividad específica de la aromatasa en las gónadas embrionarias de *C. latirostris*, con su patrón de expresión citoplasmático y punteado, característico. La expresión de la enzima mostró una disminución hacia el final del desarrollo en las hembras DST ( $p < 0.05$ ). La aromatasa fue significativamente menor en los machos en relación con las hembras en las tres etapas estudiadas ( $p < 0.05$ ). A su vez, hubo una caída en la expresión de la proteína hacia el final del desarrollo en los machos-DST (Fig. 16).





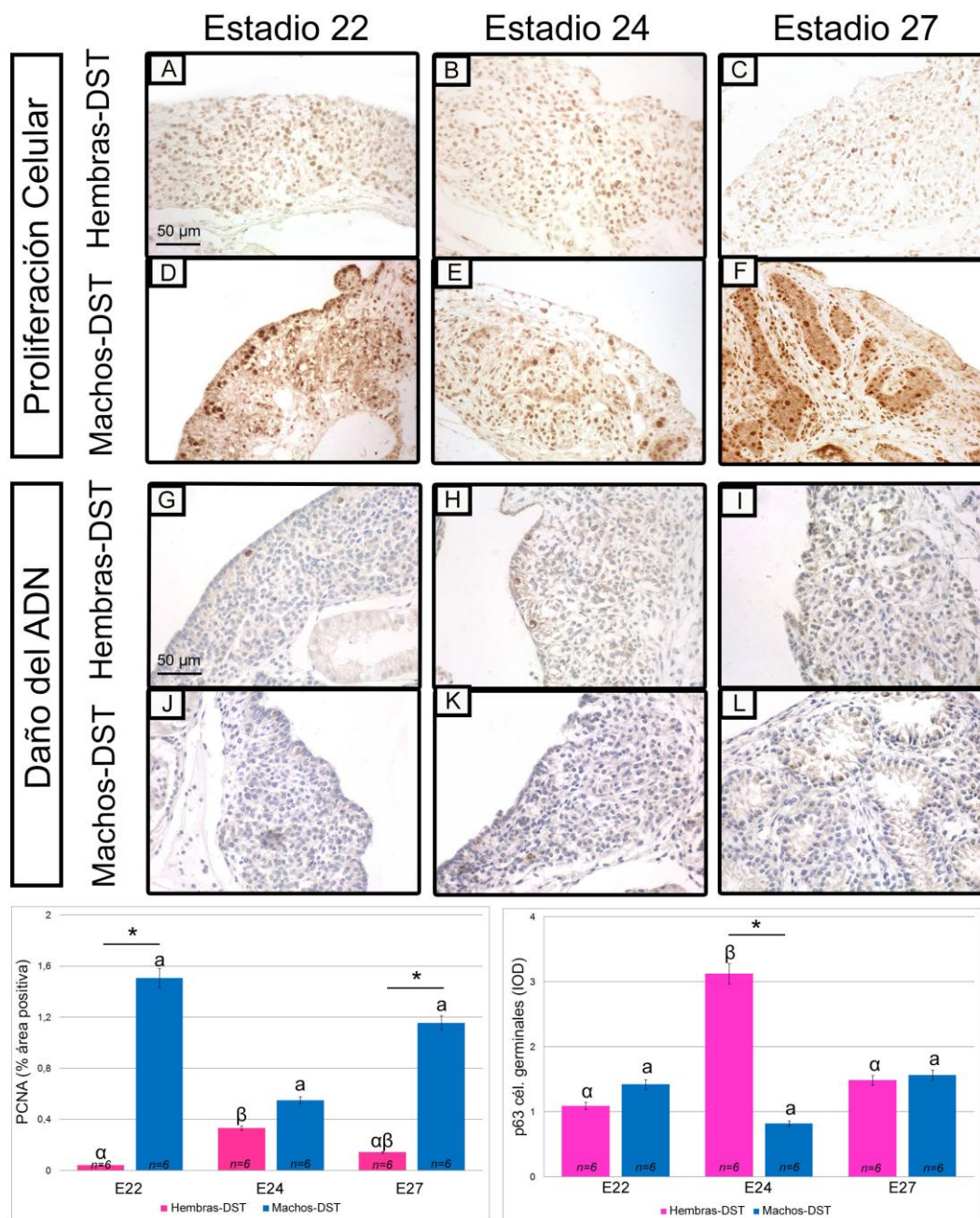
**Figura 16:** Expresión de aromatasa en las gónadas embrionarias de *C. latirostris*. Cortes histológicos que muestran el patrón de inmunomarcación de aromatasa en diferentes estadios embrionarios de desarrollo y las condiciones de incubación a temperatura productora de hembras (TPH - 30°C) frente a temperatura productora de machos (TPM - 33°C). La expresión de aromatasa en hembras DST en las etapas 22, 24 y 27 (A-C). La expresión de aromatasa en machos DST en las etapas 22, 24 y 27 (D-F). Panel inferior: Expresión de aromatasa cuantificada como porcentaje del área positiva. Los valores representan la media  $\pm$  SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas a  $p < 0,05$  por la prueba U de Mann-Whitney (comparando cada estadio en las condiciones de tratamiento DST vs. DSE2) o Kruskal-Wallis seguido por la prueba post de Dunn; (Comparando cada condición de tratamiento a lo largo de las tres etapas estudiadas) la significancia estadística se muestra en este caso con letras griegas para el grupo hembras-DST y letras latinas para los machos-DST. Muestras por grupo tratamiento  $n=6$ .

### 5.1.6. Actividad proliferativa y daño en el ADN

En cuanto a la proliferación celular (Fig. 17 A-F), la expresión de PCNA en las hembras-DST se mantuvo baja durante todo el desarrollo, pero mostró un pico en el estadio 24. Mientras que, en los machos-DST la expresión de PCNA no varió a lo largo del desarrollo. Las diferencias entre condiciones de incubación se observaron tanto en estadio 22 como en estadio 27, siendo mayor la proliferación celular en machos que en hembras (Fig. 17- panel inferior).

Por otro lado, se detectó la proteína p63 en células germinales (VASA-positivas), de embriones de yacaré overo, la expresión de la misma permaneció baja durante el desarrollo tanto en

hembras DST como en machos DST (Fig. 17 G-L). Sin embargo, la inmunoreactividad específica para p63 fue significativamente mayor en las gónadas de las hembras DST en estadio 24 de desarrollo embrionario con respecto al grupo de machos ( $p = 0,0019$ ) (Fig. 17- panel inferior).

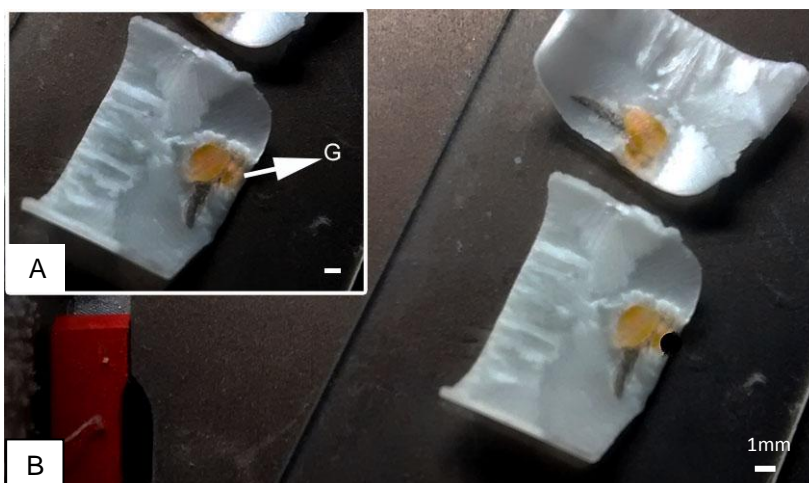


**Figura 17:** Expresión de PCNA y p63 en las gónadas embrionarias de *C. latirostris*. Cortes histológicos que muestran el patrón de inmunomarcación de PCNA y p63 en diferentes estadios embrionarios de desarrollo y las condiciones de incubación a temperatura productora de hembras (TPH - 30°C) frente a temperatura productora de machos (TPM - 33°C). La expresión de PCNA en hembras DST en las etapas 22, 24 y 27 (A-C). La expresión de PCNA en machos DST en las etapas 22, 24 y 27 (D-F). Expresión de p63 en hembras DST en las etapas 22, 24 y 27 (G-I). Expresión de p63 en machos DST en las etapas 22,

24 y 27 (J-L). Panel inferior: Expresiones de PCNA y p63 cuantificadas como porcentaje del área positiva. Los valores representan la media  $\pm$  SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas a  $p < 0,05$  por la prueba U de Mann-Whitney (comparando cada estadio en las condiciones de tratamiento de DST frente a DSE<sub>2</sub>) o Kruskal-Wallis seguido de la prueba de Dunn (comparando cada condición de tratamiento a lo largo de las tres etapas estudiadas) En este caso con letras griegas para la condición hembras DST y letras latinas para machos DST. Muestras por grupo tratamiento  $n=6$ .

### 5.1.7. Micropunción y expresión génica

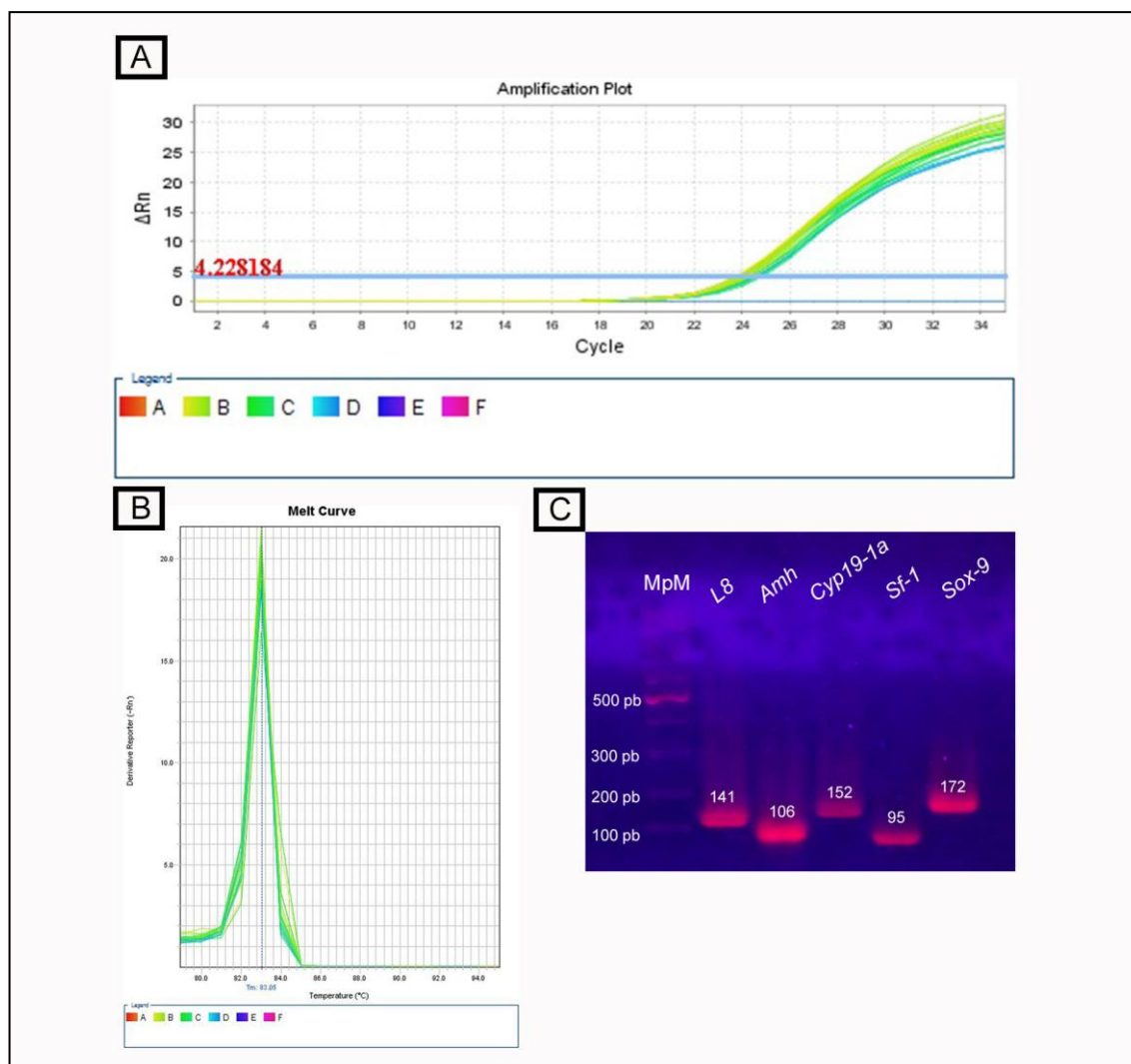
Utilizando el método de micropunción aislamos la porción enriquecida en gónada en todos los grupos experimentales y en los tres estadios embrionarios estudiados. (Fig. 18A-B). Obteniendo una masa final de ARN entre 1-2  $\mu$ g por muestra, ( $n=6$  por grupo experimental y por estadio), lo que nos permitió evaluar por RT-qPCR la expresión de los genes: *amh*, *cyp191a* – *aromatasa*, *sfl* y *sox9*, como así también del gen constitutivo *L8* (*proteína ribosomal*). Dado que el método de cuantificación fue mediante curva estándar relativa, hemos realizado las curvas pertinentes, logrando eficiencias entre 98-102%.



**Figura 18:** Cortes del complejo GAM de *C. latirostris* en estadio 27 de desarrollo embrionario, (realizados con criostato). **A:** Se muestra la estructura incluida en OCT a mayor aumento. **B:** El punto oscuro hace referencia a la ausencia del tejido gonadal; una vez realizada la **micropunción**.

En la figura 19 se muestra una curva de qPCR perteneciente al gen L8 (Fig.19.A). Sin observarse diferencias significativas en los valores de Ct del gen de expresión constitutiva, entre los grupos experimentales. Mediante la curva de disociación (*melting curve*), se establece la pureza del producto de amplificación (Fig.19.B) y se confirma mediante electroforesis en gel de agarosa (Fig.19.C). Pudimos establecer la pureza de todos los productos de amplificación evaluados (Fig. 18C).

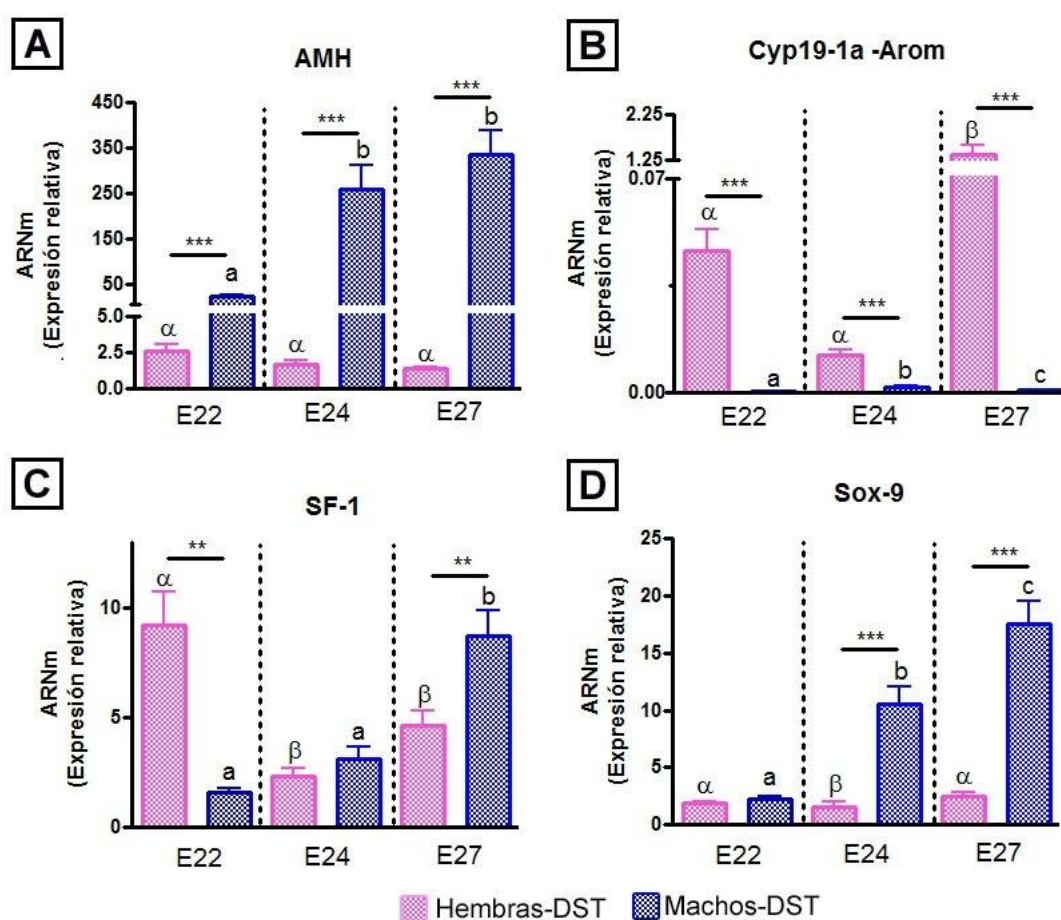




**Figura 19:** A: Curva representativa de qPCR del gen constitutivo *L8* detectada mediante el sistema *Real-Time DNA Step One Cycler* (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA). B: Curva de disociación (*melting curve*) para el mismo gen, mediante la cual se establece la pureza del producto de amplificación. C: gel de agarosa al 1,5 %, mostrando los productos de amplificación de todos los genes evaluados; *L8*, *amh*, *cyp19a1* –aromatasa, *sf1* y *sox9*. MpM: Marcador de peso molecular.

La expresión relativa para el gen *amh* se mantuvo baja en las hembras-DST, durante los tres estadios de desarrollo embrionario estudiados, mientras que en los machos-DST fue aumentando conforme avanzaba el desarrollo ( $p < 0.05$ ). La expresión relativa de *amh* fue mayor en los machos-DST respecto a las hembras-DST en los tres estadios estudiados ( $p < 0.005$ ) (Fig.20A). En cuanto al gen *cyp19a1* que codifica para la enzima esteroideogénica aromatasa, su expresión relativa aumentó hacia el final del desarrollo en hembras ( $p < 0.05$ ) sin presentar cambios a lo largo del desarrollo en machos. La expresión fue menor en los machos-DST respecto a las hembras-DST en los tres estadios estudiados ( $p < 0.005$ ) (Fig.20B). El gen *sf-1* que codifica para la proteína homónima, el factor esteroideogénico 1, disminuyó su expresión relativa en estadio 24 y 27 respecto al estadio 22 en hembras-DST; mientras que en machos-

DST aumentó la expresión del mismo hacia el estadio 27. Se observó diferencia significativa entre machos y hembras en estadio 22 (siendo mayor en hembras) y en estadio 27, siendo mayor la expresión de *sf-1* en machos (Fig.20C). La expresión relativa de *Sox-9* se mantuvo sin cambios a lo largo del desarrollo embrionario estudiado en hembras-DST, mientras que en los machos *Sox-9* aumentó su expresión, conforme avanzaba el desarrollo ( $p < 0.05$ ). Se observó dimorfismo sexual para este gen en estadio 24 y 27 siendo mayor la expresión en machos-DST. (Fig.20D).

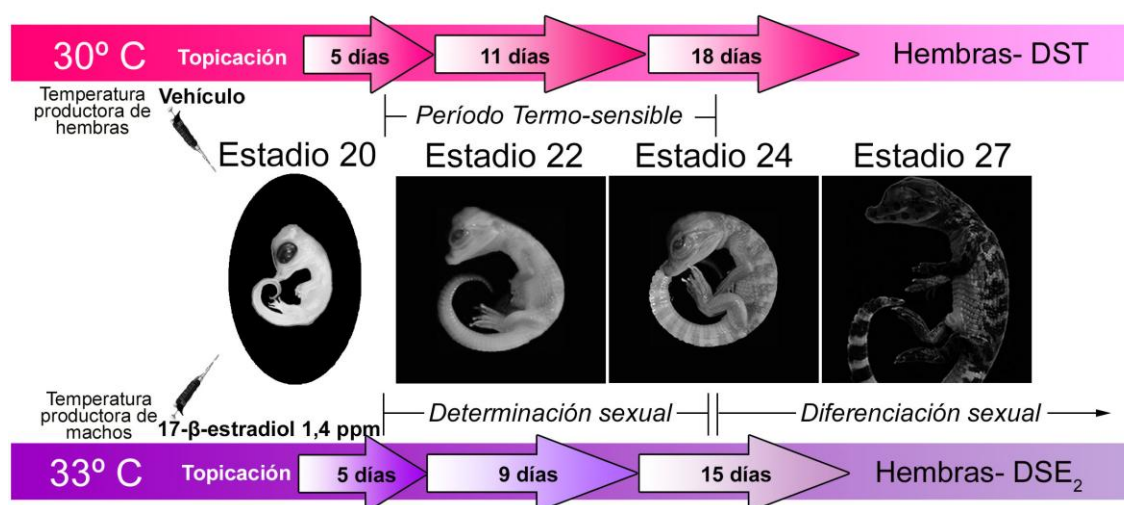


**Figura 20:** Expresión relativa del ARNm de los genes A: *amh*, B: *Cyp19-1a* C: *SF-1* D: *Sox-9* en las gónadas embrionarias de *C. latirostris*, Los valores representan la media  $\pm$  SEM. El  $n$  de muestras fue de 6 por grupo experimental y por estadio. Los asteriscos indican diferencias significativas a  $p < 0,05$  por el test t de student (comparando cada estadio en las condiciones de tratamiento hembras-DST vs. machos-DST) o ANOVA unidireccional seguido por la prueba posterior de Tukey; (Comparando cada condición de tratamiento a lo largo de las tres etapas estudiadas; E22, E24, y E27) la significancia estadística se muestra en este caso con letras griegas para el grupo hembras-DST y letras latinas para los machos-DST.

## 5.2. Hembras: Aspectos de la Determinación Sexual por Temperatura (DST) y la Determinación sexual inducida por estrógenos (DSE<sub>2</sub>).

### 5.2.1. Obtención de embriones de *Caiman latirostris* en estadios 22, 24 y 27 de desarrollo.

Tal como se ha descripto en la sección: 5.1.1 ilustrándose en la figura 21, en este experimento no se observaron diferencias en el período de incubación debido al tratamiento con estradiol [9].



**Figura 21.** Esquema que muestra la secuencia de los principales acontecimientos en el desarrollo de las gónadas embrionarias de *C. Latirostris*. Las hembras se obtuvieron 30°C - temperatura de producción femenina y 33°C - temperatura de producción masculina + 1,4 ppm de 17β-estradiol (E<sub>2</sub>). Las flechas muestran el tiempo en días necesarios para pasar a la siguiente etapa que difiere entre las temperaturas de incubación. Los tratamientos (Vehículo y E<sub>2</sub>) se aplicaron en la etapa 20, antes del período termo-sensible. Las etapas estudiadas fueron elegidas considerando los períodos de determinación del sexo (E21 a E24) y diferenciación gonadal (E24 a post-eclosión). Las hembras se obtuvieron a ambas temperaturas de incubación y se les llamó: Determinación del Sexo por Temperatura (hembras- DST) o Determinación del Sexo inducida por Estrógenos (hembras- DSE<sub>2</sub>).

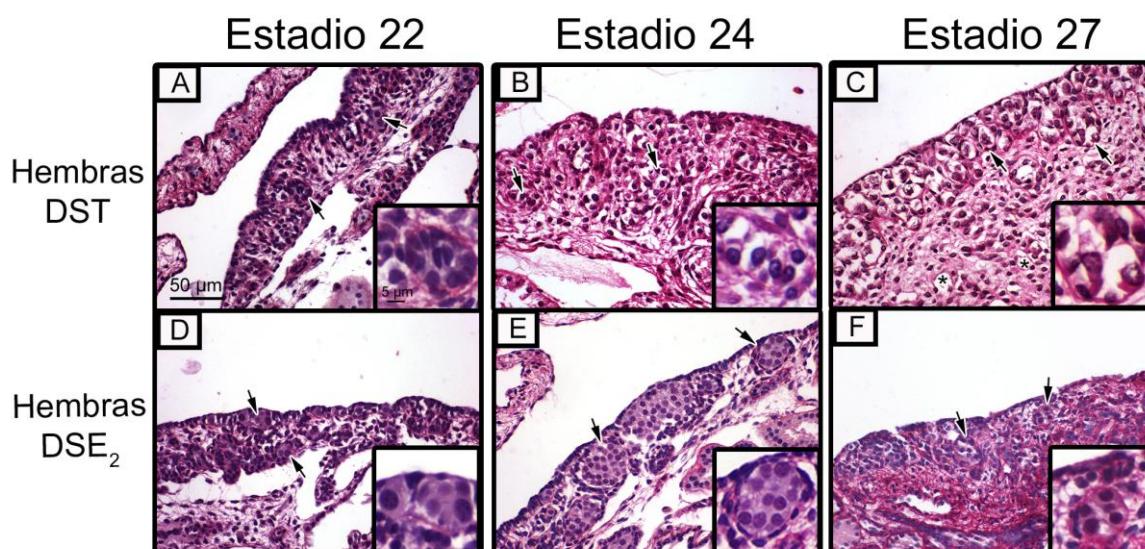
### 5.2.2. Cambios histo-morfológicos durante el desarrollo de las gónadas.

Histológicamente en la etapa 22, la gónada en ambas condiciones de incubación (30°C o 33°C + 1,4 ppm E<sub>2</sub>) comprende un epitelio germinal externo y cordones medulares subyacentes. En las secciones transversales, la gónada está compuesta por una corteza bien definida y la médula (Fig. 22A y D). En la corteza, las células germinales se distribuyen dentro de un epitelio pseudoestratificado a estratificado de células epiteliales columnares. Las células germinales se observan ocasionalmente en la médula, solas o formando nidos. La médula contiene cordones

celulares poco organizados, separados por células mesenquimales oscuras. Los espacios vacíos que se ven en la médula, podrían ser el primer signo de la diferenciación de la gónada de la hembra. A pesar de ello, no hay signos consistentes de diferenciación sexual gonadal en la etapa 22 a 30°C ni a 33°C + E<sub>2</sub> (Fig. 22A y D).

En la etapa 24 hay un aumento en el tamaño y celularidad de la gónada. Los nidos de células germinales son más en cantidad y más organizados tanto en la corteza como en la médula. El inicio de la diferenciación de la gónada de la hembra implica la delimitación de los nidos germinales y la presencia de signos de regresión de la médula que son claros en esta etapa, tanto en las condiciones de incubación a 30°C como a 33°C + E<sub>2</sub> (Figuras 22B y E). Las gónadas femeninas en la etapa 24 obtenidas por incubación a 30°C (DST) difieren de las obtenidas por incubación a 33°C + 1.4 ppm E<sub>2</sub> (hembras DSE<sub>2</sub>) en que las últimas poseen más número de células en general y menos espacios vacíos en la médula.

El estadio 27 en las hembras DST se caracteriza por un aumento en el número de células germinales agrupadas en conglomerados y una mayor delimitación de los cúmulos por las células estromales. La médula aparece en mayor regresión y las lagunas típicas comienzan a ser observadas (Fig. 22C). En las hembras DSE<sub>2</sub>, la etapa 27 sólo difiere de la descripción de las hembras DST en que, la celularidad de la gónada en DSE<sub>2</sub> es exacerbada y hay menos espacios vacíos debido al aumento de la matriz extracelular (Fig. 22F).



**Figura 22:** Estructura de las gónadas de *C. latirostris* en diferentes etapas de desarrollo embrionario. Hembras producidas por temperatura y por estrógenos. Fotomicrografías representativas de las gónadas en diferentes estadios de desarrollo (E22, E24 y E27), y en dos condiciones de determinación del sexo: por temperatura (DST) e inducida por estrógenos (DSE<sub>2</sub>). Las flechas muestran un grupo de células

germinales. El recuadro muestra una mayor ampliación de esos nidos. Los asteriscos muestran cavidades irregulares que dan lugar a las lagunas. Los cambios se observan en las diferentes condiciones de incubación (30°C y 33°C + E<sub>2</sub>) desde la etapa 24. El inicio de la diferenciación femenina implica la delimitación de los nidos y la presencia de signos de regresión de la médula que son claros en esta etapa en ambas condiciones de incubación. Las hembras DSE<sub>2</sub> poseen una mayor celularidad en general y menos espacios vacíos en la médula, diferencia que se exagera en la etapa 27. Secciones transversales de tejido, teñidas con la solución tricrómica de Picrosirius- hematoxilina de Harris.

### 5.2.3. Expresión de los receptores hormonales

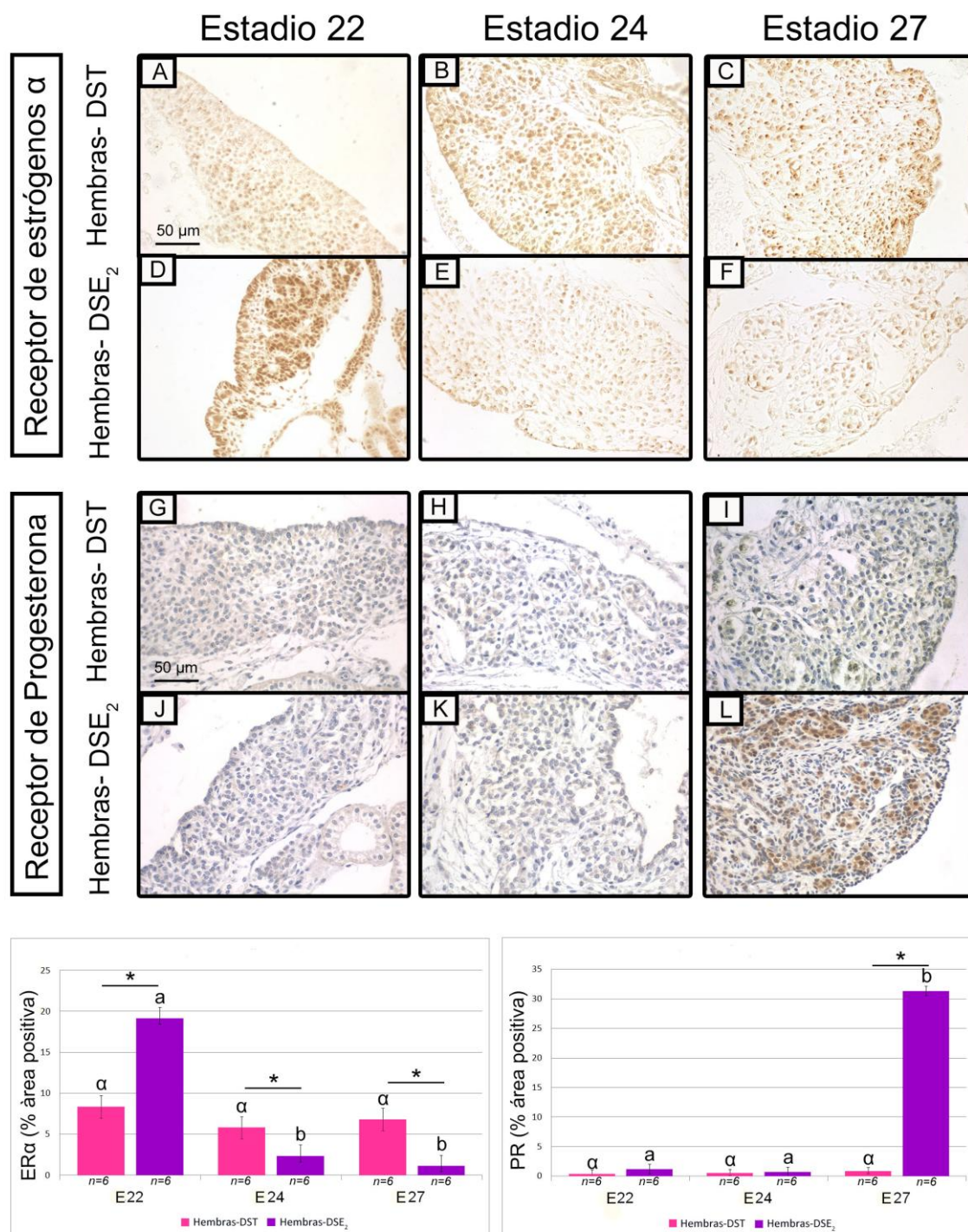
Se evaluó por IHQ si la expresión de receptor de estrógeno alfa (ER  $\alpha$ ) y el receptor de progesterona (PR) difieren entre las hembras DST y DSE<sub>2</sub>. ER $\alpha$ , se detectó como una proteína nuclear en las gónadas embrionarias. Su expresión no se modificó a lo largo de las etapas de desarrollo evaluadas en las hembras DST. Mientras que en las hembras DSE<sub>2</sub> se observó un aumento en el inicio de PTS, cayendo hacia el final del desarrollo, en las etapas 24 y 27 (p=0,0302). El grupo DSE<sub>2</sub> mostró una mayor expresión de ER $\alpha$  en la etapa 22 (p=0,0286), mientras que en las otras etapas de desarrollo, la expresión fue menor en este grupo que las hembras DST (ambos p <0,05) (Fig. 23 A-F).

Del mismo modo que ER $\alpha$ , el PR mostró un patrón nuclear en las gónadas embrionarias. La expresión de PR en las hembras DST permaneció baja a lo largo de las etapas de desarrollo estudiadas, mientras que en las hembras DSE<sub>2</sub> su expresión aumentó significativamente hacia el final del desarrollo embrionario (p = 0,0082). En la etapa 27, la expresión de PR fue significativamente mayor en DSE<sub>2</sub> vs DST (p = 0,0121) (Fig. 23 G-L).

### 5.2.4. Expresión de aromatasa

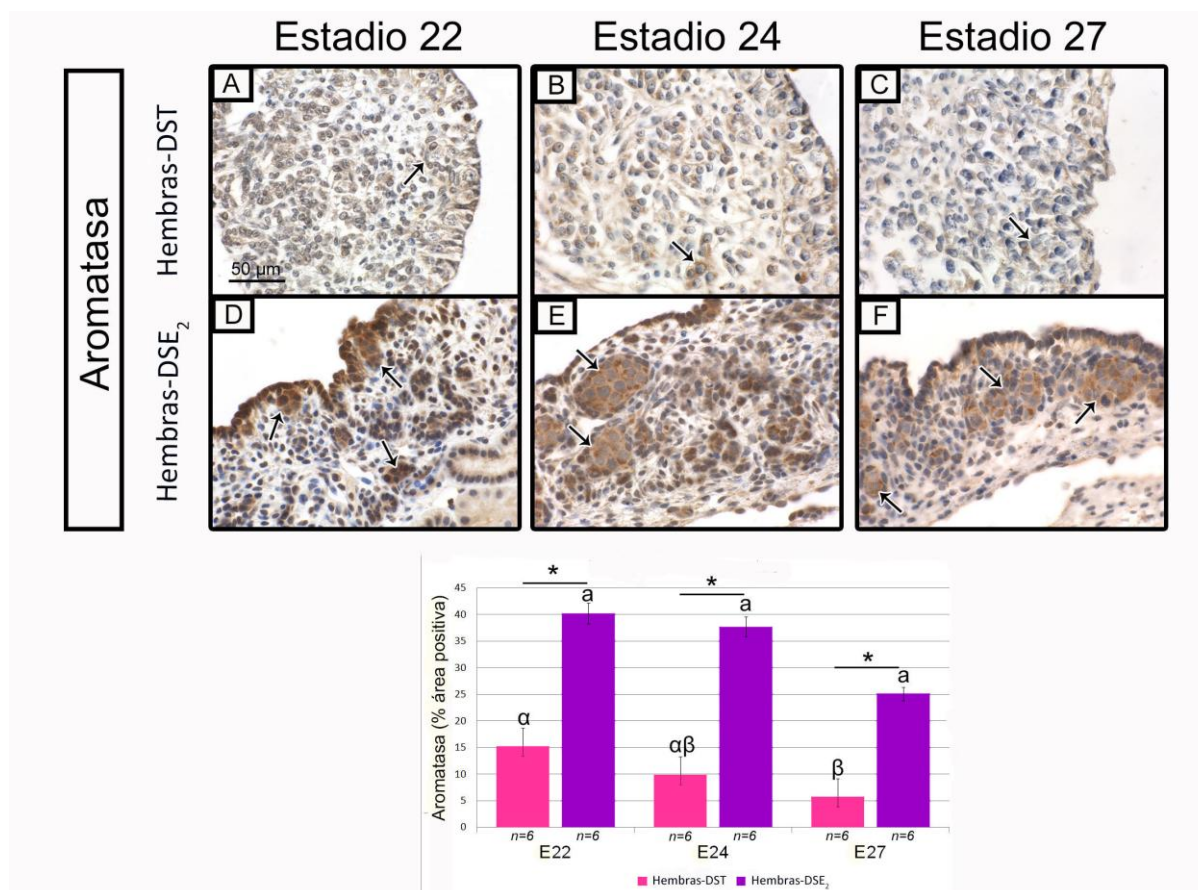
La expresión de la enzima mostró una disminución hacia el final del desarrollo en las hembras DST (p=0,0086). La aromatasa fue significativamente mayor en las hembras tratadas con E<sub>2</sub> en relación con las DST en las tres etapas estudiadas (p<0,05). Sin embargo, no se modificó a lo largo del desarrollo en las hembras DSE<sub>2</sub> (Fig. 24A-F).





**Figura 23:** Expresión de los receptores de hormonas esteroides sexuales en las gónadas embrionarias de *C. latirostris*. Cortes histológicos que muestran el patrón de inmunomarcación de ER $\alpha$  y PR en diferentes estadios embrionarios de desarrollo y en dos condiciones de determinación del sexo: por temperatura (DST) e inducida por estrógenos (DSE<sub>2</sub>). La expresión de ER $\alpha$  en hembras DST en las etapas 22, 24 y 27 (A-C). La expresión de ER $\alpha$  en hembras DSE<sub>2</sub> en las etapas 22, 24 y 27 (D-F). Expresión de PR en hembras DST en las etapas 22, 24 y 27 (G-I). Expresión de PR en DSE<sub>2</sub> hembras en las etapas 22, 24 y 27 (J-L). Panel inferior: Expresiones de ER $\alpha$  y PR cuantificadas como porcentaje del área positiva y porcentaje de células positivas, respectivamente. Los valores representan la media  $\pm$  SEM. Los asteriscos

indican diferencias significativas a  $p < 0,05$  por la prueba U de Mann-Whitney (comparando cada estadio en las condiciones de tratamiento de DST frente a  $DSE_2$ ) o Kruskal-Wallis seguido de la prueba de Dunn (comparando cada condición de tratamiento a lo largo de las tres etapas estudiadas) En este caso con letras griegas para la condición DST y letras latinas para  $DSE_2$ . Muestras por grupo tratamiento  $n=6$ .



**Figura 24:** Expresión de aromatasa en las gónadas embrionarias de *C. latirostris*. Secciones histológicas que muestran el patrón de inmunomarcación de aromatasa representativo en diferentes etapas de desarrollo embrionario en el sexo femenino determinado por dos condiciones: temperatura (DST) e inducida por estrógenos ( $DSE_2$ ). La expresión de aromatasa en hembras DST en las etapas 22, 24 y 27 (A-C). Expresión de la aromatasa en hembras  $DSE_2$  en las etapas 22, 24 y 27 (D-F). Panel inferior: Expresión de aromatasa cuantificadas como porcentaje del área positiva. Los valores representan la media  $\pm$  SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas a  $p < 0,05$  por la prueba U de Mann-Whitney (comparando cada estadio en las condiciones de tratamiento DST vs.  $DSE_2$ ) o Kruskal-Wallis seguido por la prueba post de Dunn; (Comparando cada condición de tratamiento a lo largo de las tres etapas estudiadas) la significación estadística se muestra en este caso con letras griegas para la condición DST y letras latinas para  $DSE_2$ . Muestras por grupo tratamiento  $n=6$ .

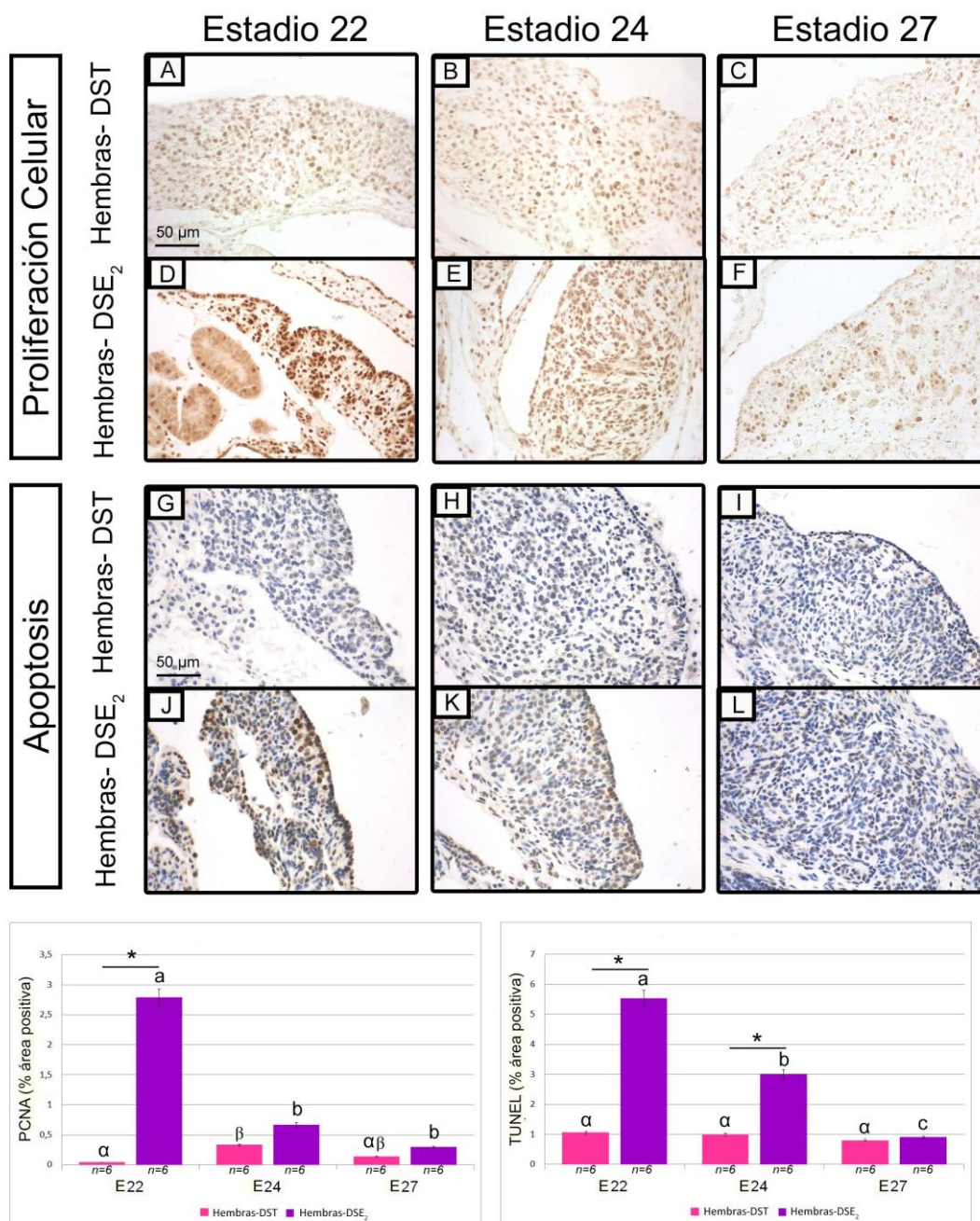
### 5.2.5. Actividad proliferativa, daño al ADN y apoptosis

En cuanto a la proliferación celular, la expresión de PCNA en las hembras DST se mantuvo baja durante todo el desarrollo. Por otra parte, se observó una alta expresión de PCNA en la etapa 22 en el grupo DSE<sub>2</sub> seguida por una caída significativa ( $p < 0,05$ ) en la etapa 24 manteniéndose baja hasta la etapa 27. La proliferación celular en la etapa 22 es significativamente mayor en las hembras DSE<sub>2</sub> que en las DST ( $p = 0,0028$ ) (Fig. 25A-F).

El ensayo de TUNEL mostró en las hembras DST un bajo nivel de apoptosis en las etapas 22 y 24 con un aumento significativo en la etapa 27 ( $p < 0,05$ ). En cuanto a las hembras DSE<sub>2</sub>, el porcentaje de apoptosis en la etapa 22 fue de  $1,8 \pm 0,6$ . En la etapa 24 se produjo un aumento significativo ( $5,5 \pm 1,3$ ) con una caída en la etapa 27 ( $1,5 \pm 0,5$ ,  $p < 0,05$ ). En las etapas 22 y 24, el porcentaje de apoptosis fue mayor en DSE<sub>2</sub> que en DST ( $p = 0,0159$ ;  $p = 0,0317$ ), sin mostrar diferencias hacia el final del desarrollo (Fig. 25 G-L).

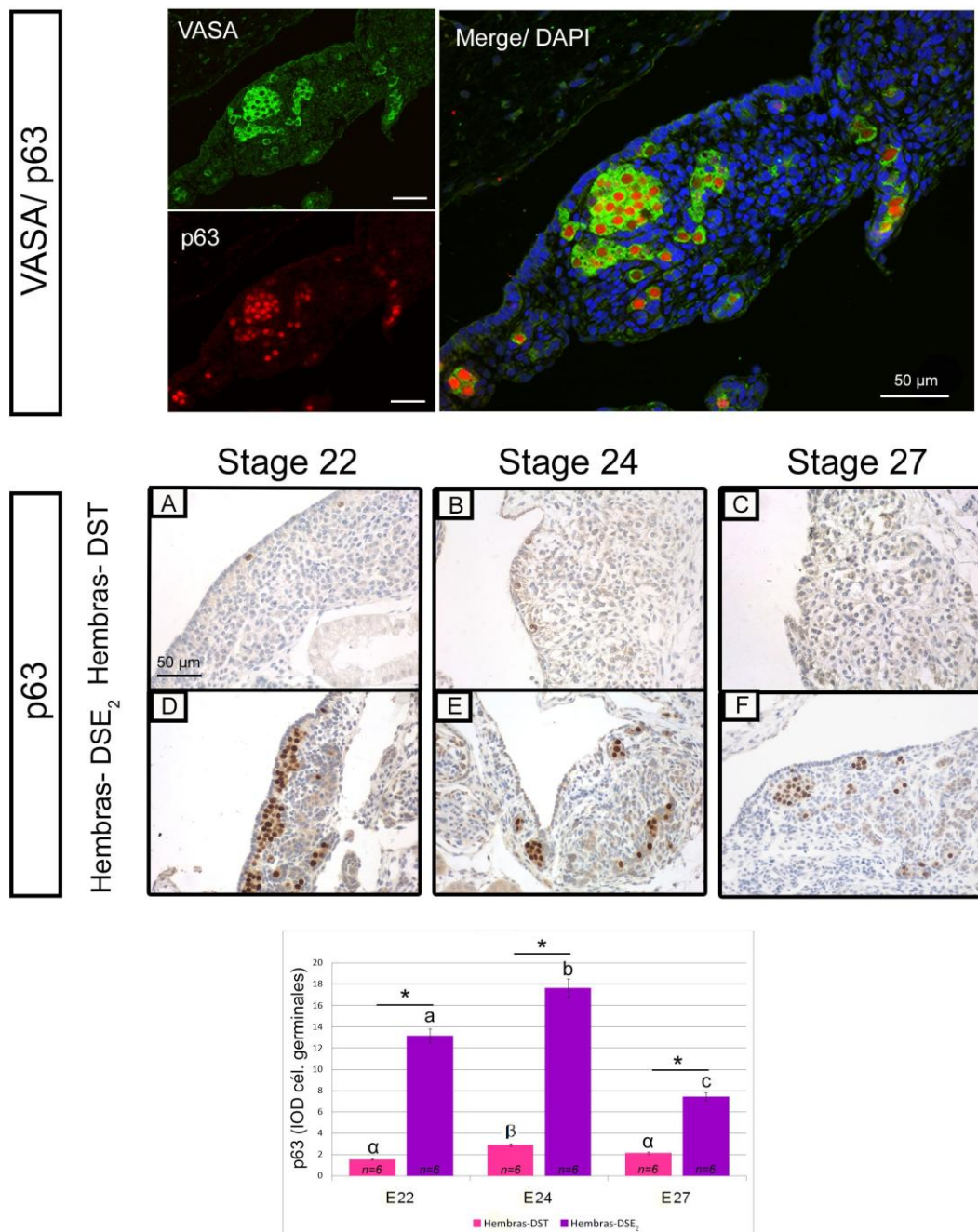
La proteína p63, mostró inmunomarcación específica en células germinales de embriones de yacaré overo (co-localización VASA/p63 - ver Fig. 26). Su expresión permaneció baja durante el desarrollo en hembras DST. Mientras que, en las hembras DSE<sub>2</sub>, se observó un aumento en la etapa 24 con respecto a la etapa anterior ( $p = 0,0156$ ), seguido de una caída hacia el final del desarrollo ( $p = 0,0181$ ). La expresión de p63 fue significativamente mayor en las gónadas de las hembras DSE<sub>2</sub> en todos los estadios embrionarios con respecto al grupo DST ( $p < 0,05$ ) (Fig. 26).





**Figura 25:** Proliferación y apoptosis en gónadas embrionarias de *C. latirostris* del sexo femenino determinado por la temperatura (DST) y el estrógeno (DSE<sub>2</sub>). Secuencias histológicas que muestran el patrón de inmunotinción de la proliferación celular (PCNA) y la apoptosis (por TUNEL) en diferentes estadios de desarrollo embrionario y en dos condiciones de determinación del sexo: por temperatura (DST) e inducida por estrógenos (DSE<sub>2</sub>). Proliferación celular en hembras DST en las etapas 22, 24 y 27 (A-C). Proliferación celular en hembras DSE<sub>2</sub> en las etapas 22, 24 y 27 (D-F). Apoptosis en las hembras DST en las etapas 22, 24 y 27 (G-I). Apoptosis en hembras DSE<sub>2</sub> en las etapas 22, 24 y 27 (J-L). Panel

inferior: La proliferación celular y la apoptosis se cuantificaron como porcentaje del área positiva. Los valores representan la media  $\pm$  SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas a  $p < 0,05$  por la prueba U de Mann-Whitney (comparando cada estadio en las condiciones de tratamiento con DST versus DSE<sub>2</sub>) o Kruskal-Wallis seguido de la prueba post de Dunn (comparando cada condición de tratamiento a lo largo de las tres etapas estudiadas) La significancia se muestra en este caso con letras griegas para la condición DST y letras latinas para DSE<sub>2</sub>. Muestras por grupo tratamiento  $n=6$ .



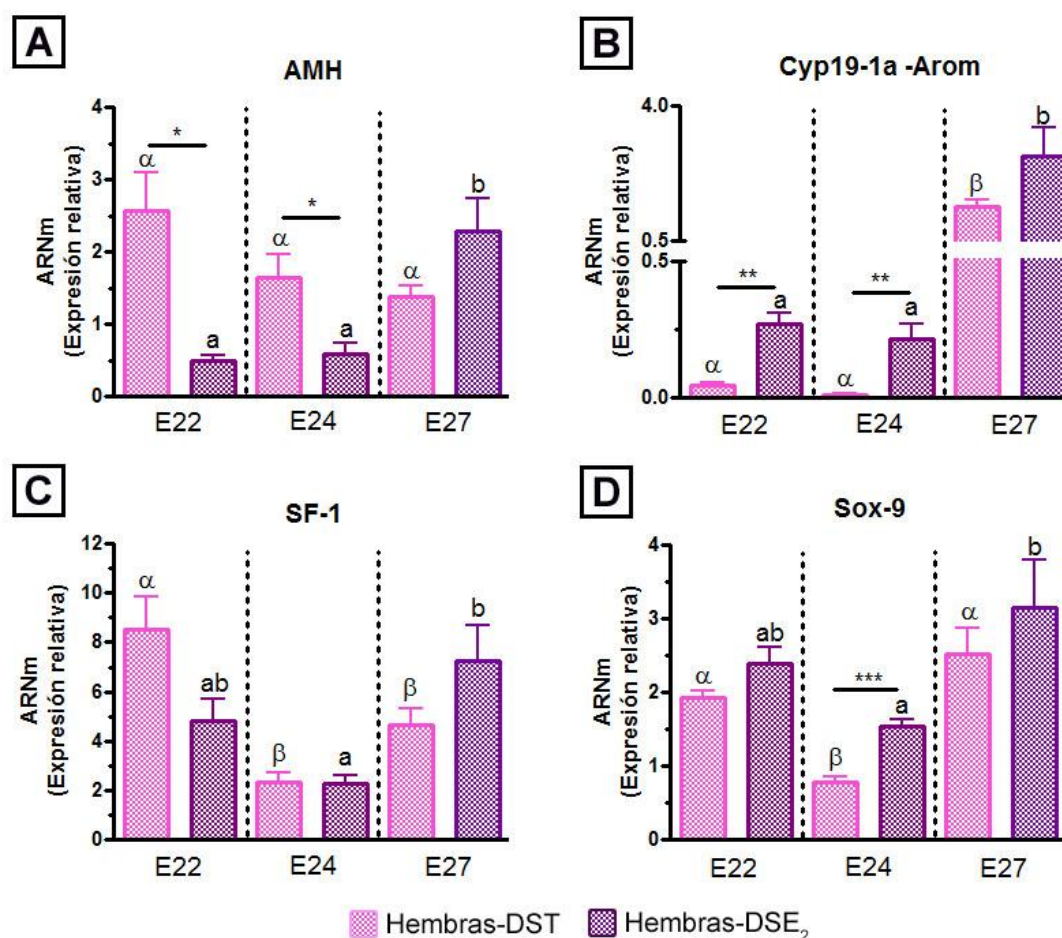
**Figura 26:** Daño del ADN en células germinales de gónadas embrionarias de *C. latirostris*. Fotomicrografías representativas de la tinción por inmunofluorescencia doble para VASA / p63, que muestra las gónadas de un embrión de *C. latirostris* inducido por estrógenos(DSE<sub>2</sub>) en el estadio 24 de

desarrollo. Secciones histológicas con inmunofluorescencia citoplasmática VASA (verde), mostrando la presencia de nidos de células germinales y la inmunofluorescencia p63 (roja) con localización nuclear, mostrando el daño en el ADN de estas células germinales. En la fusión, se muestra la co-localización de ambas moléculas. Los núcleos negativos para estas proteínas, se tiñeron con DAPI. Panel central: expresión de p63 en las hembras con determinación sexual por temperatura (DST) en las etapas 22, 24 y 27 (A-C). Expresión de p63 en hembras DSE<sub>2</sub> en las etapas 22, 24 y 27 (D-F). Panel inferior: expresión de p63 cuantificadas como densidad óptica integral (IOD) en los nidos de células germinales. Los valores representan la media  $\pm$  SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas a  $p < 0,05$  por la prueba U de Mann-Whitney (comparando cada estadio en las condiciones de tratamiento con DST versus DSE<sub>2</sub>) o Kruskal-Wallis seguido de la prueba post de Dunn (comparando cada condición de tratamiento a lo largo de las tres etapas estudiadas), la significancia se muestra en este caso con letras griegas para la condición DST y letras latinas para DSE<sub>2</sub>. Muestras por grupo tratamiento  $n=6$ .

### 5.2.6. Micropunción y expresión génica

Utilizando el método de micropunción aislamos la porción enriquecida en gónada en todos los grupos experimentales y en los tres estadios embrionarios estudiados. Obteniendo una masa final de ARN entre 1-2  $\mu$ g por muestra, ( $n=6$ , por grupo experimental y por estadio), lo que nos permitió evaluar por RT-qPCR la expresión de los genes: *cyp19a1* – aromatasa, *sox9*, *sf1* y *amh*, como así también del gen constitutivo *L8* (*proteína ribosomal*). El detalle de la puesta a punto del ensayo se explicó en la sección de resultados 4.1.5.

La expresión relativa para el gen *amh* se mantuvo sin cambios en las hembras-DST a lo largo del desarrollo embrionario estudiado, mientras que en las hembras-DSE<sub>2</sub> aumentó hacia el estadio 27 ( $p < 0.05$ ). La expresión relativa de *amh* fue menor en las hembras-DSE<sub>2</sub> respecto a las hembras-DST en los estadios 22 y 24 ( $p < 0.05$ ) sin mostrar diferencias en estadio 27 (Fig.27A). En cuanto al gen *cyp19a1* que codifica para la enzima esteroideogénica aromatasa, su expresión relativa aumentó hacia el final del desarrollo, tanto en las hembras-DST como en hembras-DSE<sub>2</sub> ( $p < 0.05$ ). La expresión fue mayor en las hembras-DSE<sub>2</sub> respecto a las hembras-DST en los estadios 22 y 24 ( $p < 0.05$ ) observándose además, una clara tendencia al aumento en estadio 27, sin que esta sea significativa (Fig.27B). El gen *sf-1* se mantuvo disminuyó su expresión en el estadio 24, respecto al estadio previo en las hembras-DST, manteniéndose hacia el estadio 27. En las hembras-DSE<sub>2</sub> la expresión de este gen, aumentó hacia el final del desarrollo embrionario ( $p < 0.05$ ), sin observarse diferencias entre los grupos experimentales (Fig.27C). La expresión relativa de *Sox-9* se mantuvo disminuyó desde el estadio 22 al 24 y volvió a aumentar en la etapa 27 en las hembras-DST, mientras que en las hembras-DSE<sub>2</sub> *Sox-9* aumentó su expresión, hacia el final del desarrollo ( $p < 0.05$ ). Se observó diferencia entre ambas hembras en estadio 24 siendo mayor la expresión en hembras-DSE<sub>2</sub> (Fig.27 D).



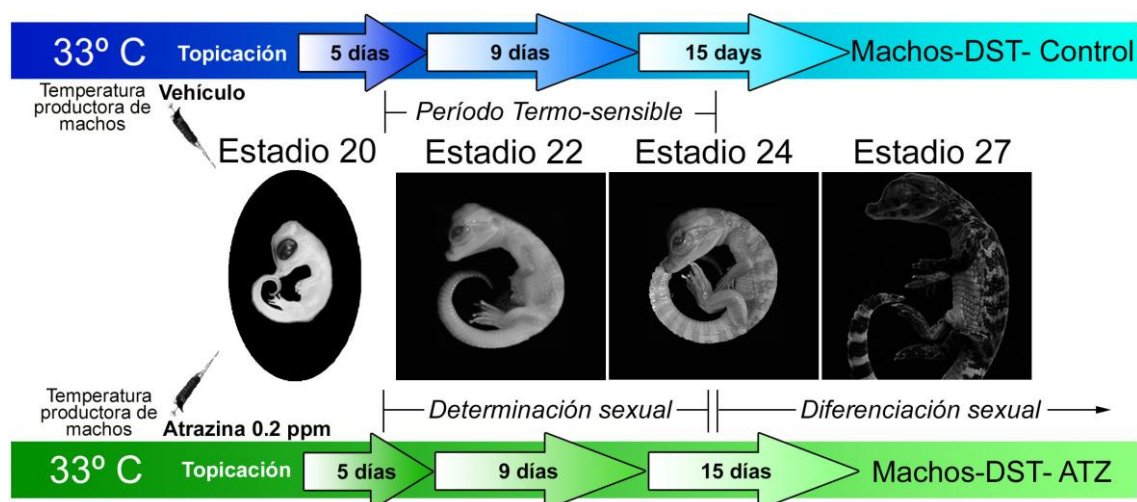
**Figura 27:** Expresión relativa del ARNm de los genes A: *amh*, B: *Cyp19-1a* C: *SF-1* D: *Sox-9* en las gónadas embrionarias de *C. latirostris*, Los valores representan la media  $\pm$  SEM. El  $n$  de muestras fue de 6 por grupo experimental y por estadio. Los asteriscos indican diferencias significativas a  $p < 0,05$  por el test t de student (comparando cada estadio en las condiciones de tratamiento hembras-DST vs. hembras-DSE<sub>2</sub>) o ANOVA unidireccional seguido por la prueba de Tukey; (Comparando cada condición de tratamiento a lo largo de las tres etapas estudiadas; E22, E24, y E27) la significancia estadística se muestra en este caso con letras griegas para el grupo hembras-DST y letras latinas para las hembras-DSE<sub>2</sub>.



### 5.3. Machos: Efectos de la exposición in ovo a Atrazina sobre la Determinación Sexual de *Caiman latirostris*.

#### 5.3.1. Obtención de embriones de *Caiman latirostris* en estadios 22, 24 y 27 de desarrollo.

Tal como se ha descrito en la sección: 5.1.1 ilustrándose en la figura.28, en este experimento no se observaron diferencias en el período de incubación debido al tratamiento con Atrazina 0,2 ppm.



**Figura 28:** Esquema que muestra la secuencia de los principales acontecimientos en el desarrollo de las gónadas embrionarias de *C. Latirostris*. Los machos se obtuvieron a 33°C - temperatura de producción masculina y a 33°C - temperatura de producción masculina + 0,2 ppm de atrazina (ATZ). Las flechas muestran el tiempo en días necesarios para pasar a la siguiente etapa en ambas condiciones de incubación. Los tratamientos (Vehículo y ATZ) se aplicaron en la etapa 20, antes del período termo-sensible. Las etapas estudiadas fueron elegidas considerando los períodos de determinación del sexo (E21 a E24) y diferenciación gonadal (E24 a post-eclosión). Los machos se obtuvieron en ambas condiciones de incubación y se los llamó: machos determinados sexualmente por temperatura –condición control (Machos-DST-Control) machos determinados sexualmente por temperatura –expuestos a ATZ (machos-DST-ATZ).

#### 5.3.2. Cambios histo-morfológicos durante el desarrollo de las gónadas.

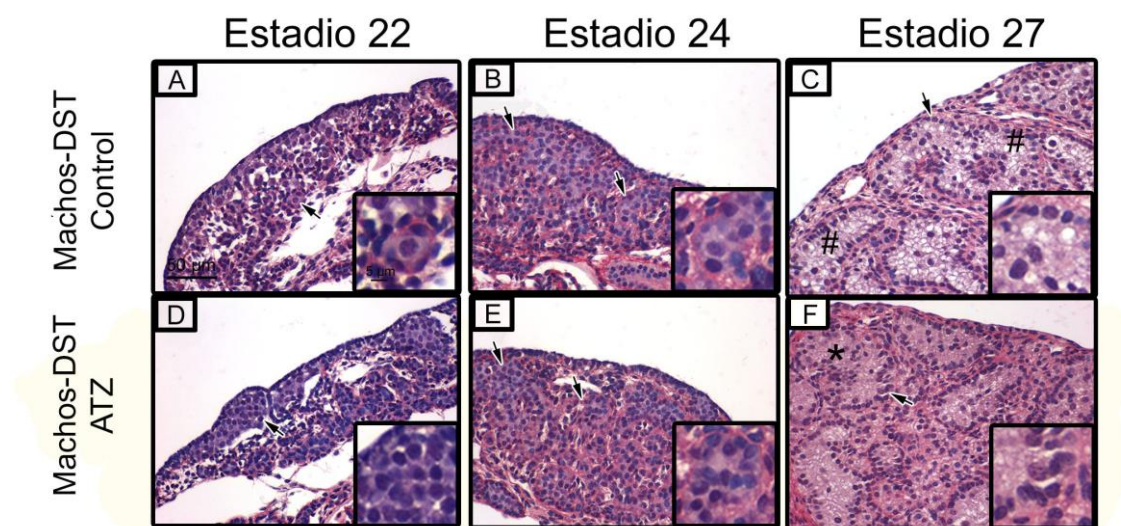
Histológicamente en la etapa 22, la gónada en ambas condiciones de incubación (TPM+vehículo ó TPM+0,2 ppm de ATZ) comprende un epitelio germinal externo y cordones medulares subyacentes. En las secciones transversales, la gónada está compuesta por una corteza bien definida y la médula (Fig. 29A y D). En la corteza, se observaron células germinales y ocasionalmente también se visualizaron en la médula, solas o formando nidos.



La médula contiene cordones celulares poco organizados, separados por células mesenquimales oscuras. No hay signos consistentes de diferenciación sexual gonadal en la etapa 22 a 33°C ni a 33°C+ATZ (Fig. 29A y D).

Las gónadas masculinas en la etapa 24 obtenidas por incubación a 33°C (machos-DST-Control) no difieren de las obtenidas por incubación a 33°C+ ATZ (machos-DST-ATZ).

El estadio 27, tanto en los machos-DST-control como en los machos-DST-ATZ, se caracteriza por un aumento en el número de células agrupadas en cordones medulares, formando los clásicos túbulos seminíferos (Fig. 29.C). Sin embargo, en los machos-DST-ATZ se observaron túbulos seminíferos tortuosos, con límites difusos y aparente incremento de la luz luminal. En esta etapa de desarrollo embrionario, ambas condiciones de producción de machos, presentan ausencia del ducto de Müller (Fig. 29.F), característica que había sido demostrada a los 10 días postnatales pero se desconocía su ausencia durante la embriogénesis.



**Figura 29:** Fotomicrografías representativas que muestran las gónadas en diferentes estadios de desarrollo (E22, E24 y E27), y en dos condiciones de incubación (a 33°C TPM+ vehículo y 33°C + 0,2 ppm de ATZ). Los signos numerales muestran los túbulos seminíferos en alto grado de desarrollo y los asteriscos aquellos túbulos tortuosos presentes en las gónadas tratadas con ATZ. Las flechas muestran un grupo de células germinales. El recuadro muestra en mayor aumento los nidos de células germinales. Secciones transversales de tejido gonadal, teñidas con la solución tricrómica de Picrosirius y contraincoloradas con hematoxilina de Harris.

### 5.3.3. Expresión de los receptores hormonales

Se evaluó por IHQ si la expresión de receptor de estrógeno alfa ( $ER\alpha$ ) y el receptor de progesterona (PR) difieren entre los machos-DST-control y los machos-DST-ATZ.  $ER\alpha$ , se detectó como una proteína nuclear en las gónadas embrionarias. Su expresión cayó hacia el final

del desarrollo en la etapa 27 ( $p=0,0302$ ) en machos-DST-control. Mientras que en los machos-DST-ATZ, la expresión de ER $\alpha$  cayó desde el estadio 22 al 24, haciéndose más pronunciada la caída hacia el estadio 27. Los machos-DST mostraron una mayor expresión de ER $\alpha$  respecto a los ATZ en la etapa 24 ( $p=0,0286$ ), mientras que en las etapas 22 y 27, la expresión no fue diferencial entre los grupos (Fig. 30 A-F).

Al igual que ER $\alpha$ , PR mostró un patrón nuclear en las gónadas embrionarias (Fig. 30 G-L). La expresión de PR en los machos-DST-control, si bien fue baja durante las etapas de desarrollo estudiadas, fue aumentando su expresión hacia el estadio 27. El mismo patrón de expresión de este receptor, mostraron los machos tratados con ATZ a lo largo del desarrollo. Se observó una diferencia entre ambos grupos en el estadio 24, donde la expresión fue menor en los machos-DST-ATZ ( $p=0,0295$ ) (Fig. 30 panel inferior).

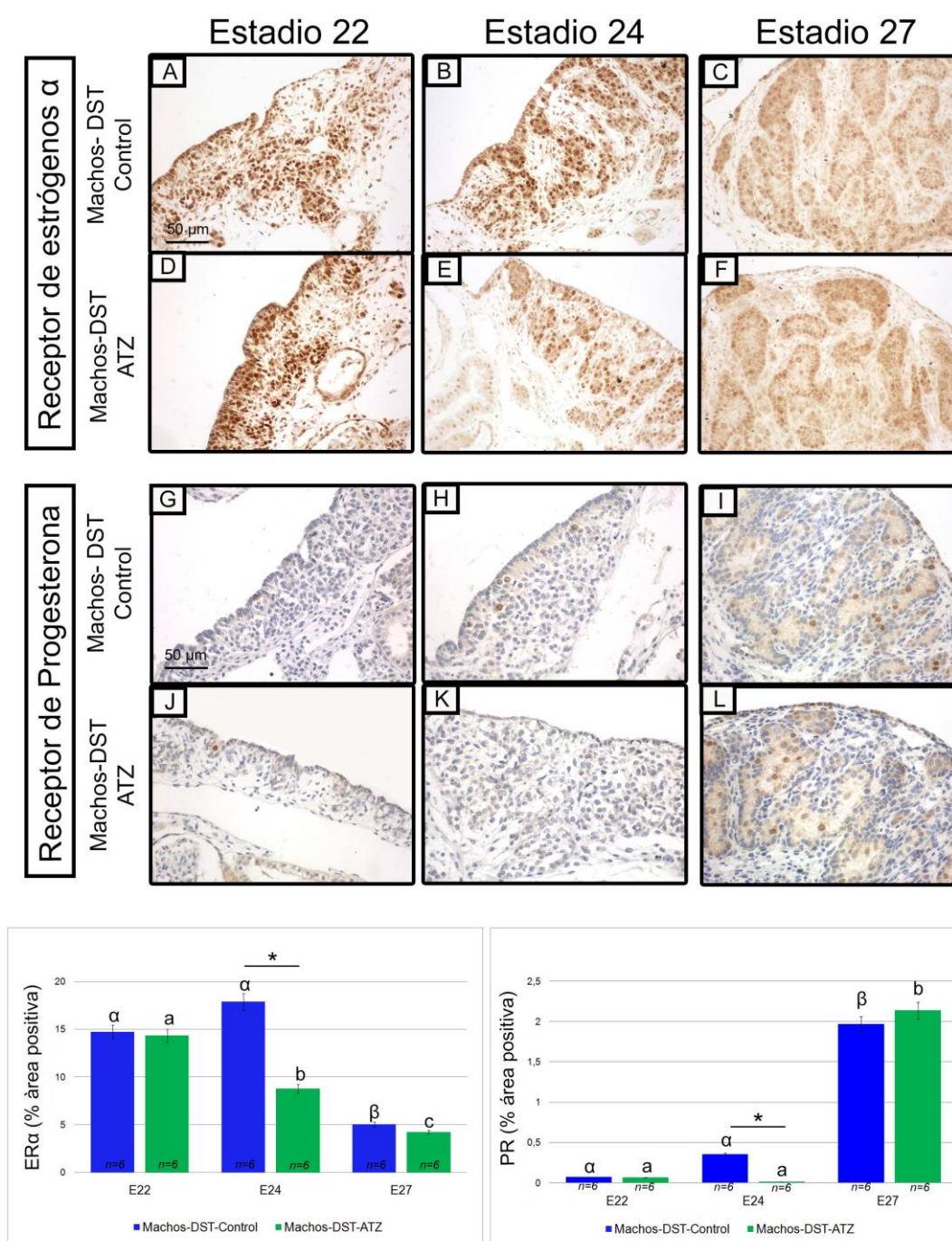
#### 5.3.4. Expresión de aromatasa

La expresión de aromatasa mostró una disminución hacia el final del desarrollo en los machos-DST-control ( $p<0,05$ ). La aromatasa fue significativamente mayor en los machos tratados con ATZ en relación con los DST-control en las tres etapas estudiadas ( $p<0,05$ ). Sin embargo, no se modificó a lo largo del desarrollo en los machos-DST-ATZ (Fig. 31).

#### 5.3.5. Actividad proliferativa y daño en el ADN

En cuanto a la proliferación celular (Fig. 32 A-F), la expresión de PCNA en los machos-DST se mantuvo baja durante todo el desarrollo. Por otra parte, en los machos-ATZ la expresión de PCNA fue máxima en la etapa 22 mostrando un descenso de la expresión conforme avanzó el desarrollo ( $p<0,05$ ). La diferencia entre condiciones de incubación se observó en estadio 22, siendo mayor la proliferación celular en machos-ATZ que en los machos-DST ( $p=0,0103$ ) (Fig. 32-panel inferior)

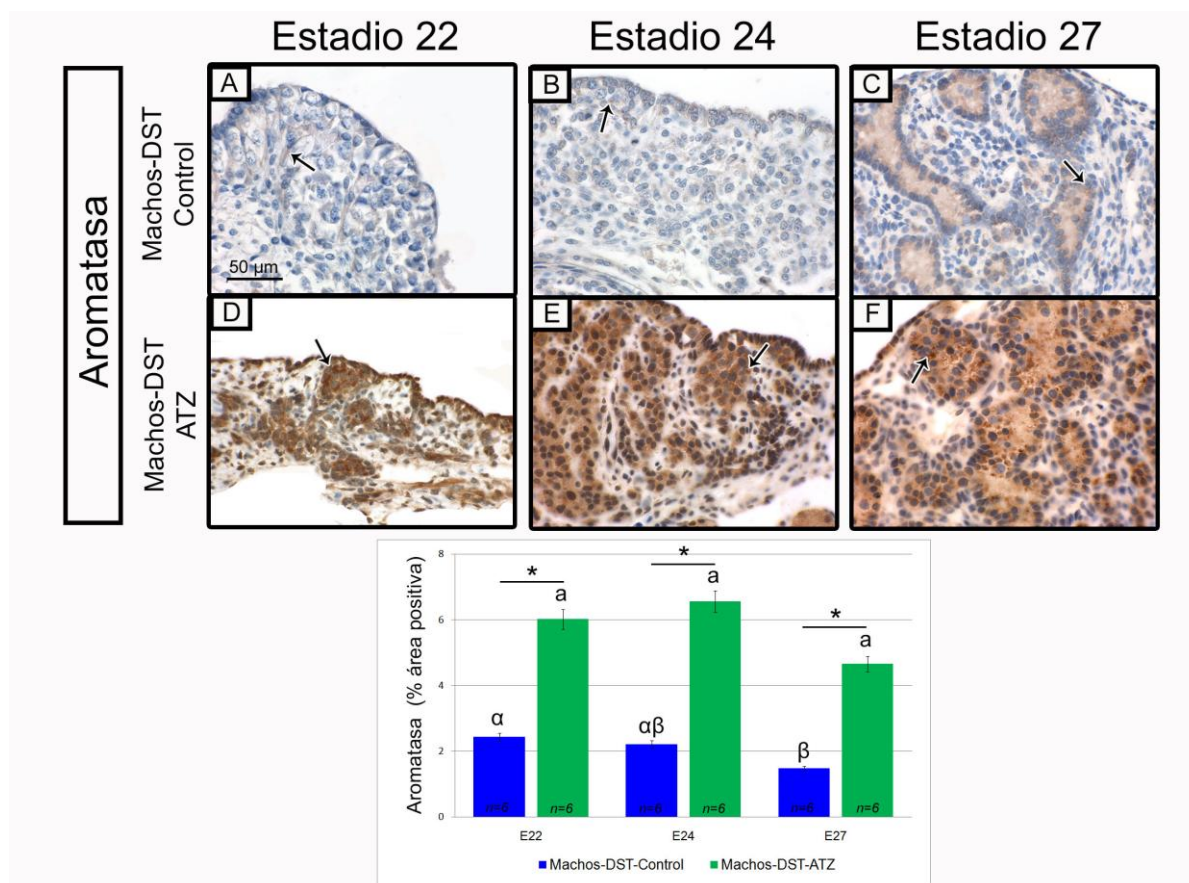
Por otro lado, la expresión de la proteína p63 (Fig. 32 G-L), permaneció baja y sin diferencias a lo largo del desarrollo para los machos-DST-control, pero mostró un pico en estadio 24 en los machos-DST-ATZ ( $p<0,05$ ). La expresión de p63 fue significativamente mayor en las gónadas de los machos tratados con ATZ en estadio 24 de desarrollo embrionario con respecto al grupo de machos-DST-control ( $p=0,0406$ ) (Fig. 32-panel inferior).



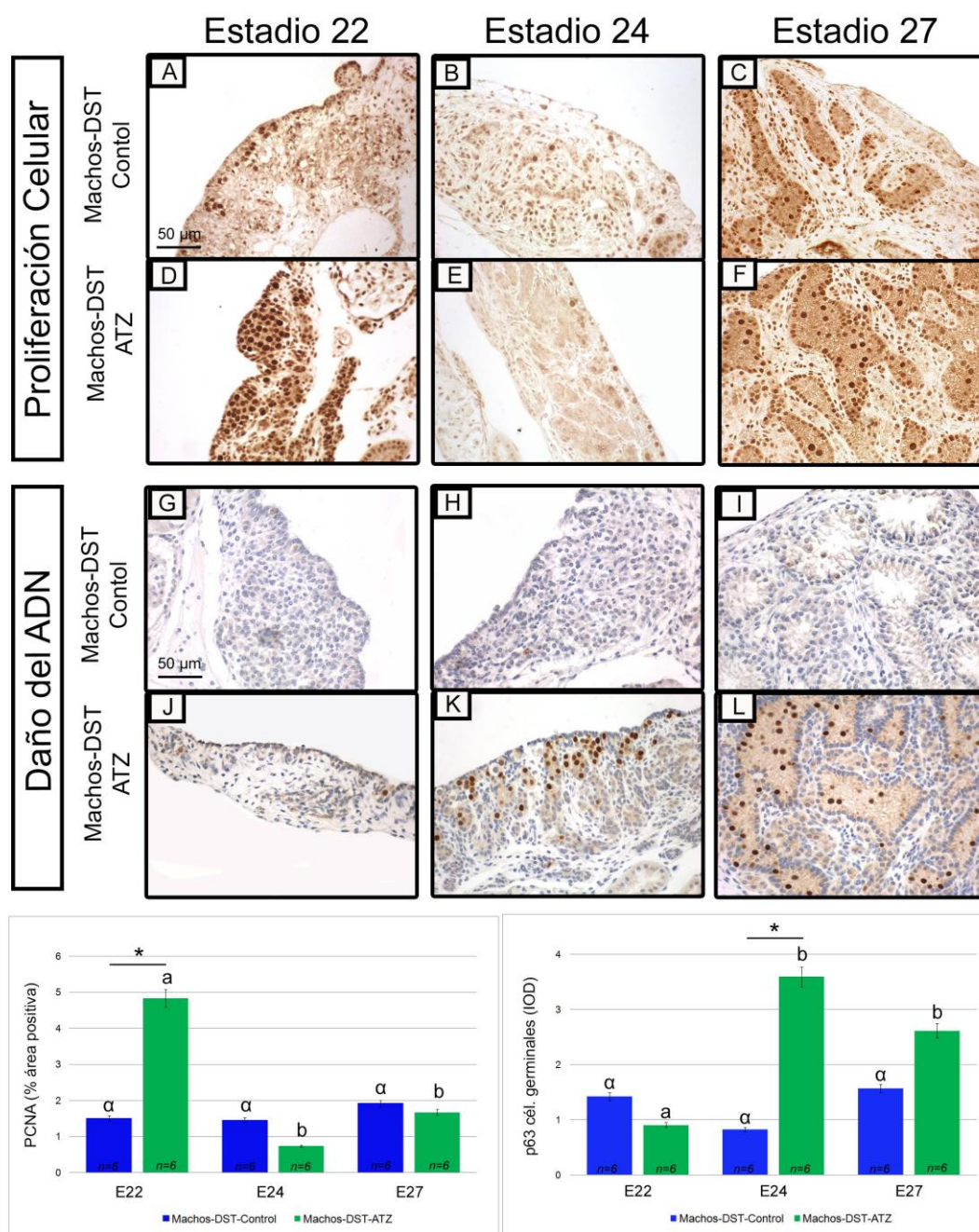
**Figura 30:** Expresión de los receptores de hormonas esteroides sexuales en las gónadas embrionarias de *C. latirostris*. Cortes histológicos que muestran el patrón de inmunomarcación de ER $\alpha$  y PR en diferentes estadios embrionarios de desarrollo y las dos condiciones de incubación (a 33°C TPM+ vehículo y 33°C + 0,2 ppm de ATZ). La expresión de ER $\alpha$  en machos-DST-control en las etapas 22, 24 y 27 (A-C). La expresión de ER $\alpha$  en machos-DST-ATZ en las etapas 22, 24 y 27 (D-F). Expresión de PR en machos-DST-control en las etapas 22, 24 y 27 (G-I). Expresión de PR en machos-DST-ATZ en las etapas 22, 24 y 27 (J-L). Panel inferior: Expresiones de ER $\alpha$  y PR cuantificadas como porcentaje del área positiva. Los valores representan la media  $\pm$  SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas a  $p < 0,05$  por la



prueba U de Mann-Whitney (comparando cada estadio en las condiciones de tratamiento de DST frente a DSE<sub>2</sub>) o Kruskal-Wallis seguido de la prueba de Dunn (comparando cada condición de tratamiento a lo largo de las tres etapas estudiadas) En este caso con letras griegas para la condición hembras DST y letras latinas para machos DST. Muestras por grupo tratamiento  $n=6$ .



**Figura 31:** Expresión de aromatasa en las gónadas embrionarias de *C. latirostris*. Cortes histológicos que muestran el patrón de inmunomarcación de aromatasa en diferentes estadios embrionarios de desarrollo y en dos condiciones de incubación (a 33°C TPM+ vehículo y 33°C + 0,2 ppm de ATZ). La expresión de aromatasa en machos-DST-control en las etapas 22, 24 y 27 (A-C). La expresión de aromatasa en machos-DST-ATZ en las etapas 22, 24 y 27 (D-F). Panel inferior: Expresión de aromatasa cuantificada como porcentaje del área positiva. Los valores representan la media  $\pm$  SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas a  $p < 0,05$  por la prueba U de Mann-Whitney (comparando cada estadio en las condiciones de tratamiento DST vs. DSE<sub>2</sub>) o Kruskal-Wallis seguido por la prueba post de Dunn; (Comparando cada condición de tratamiento a lo largo de las tres etapas estudiadas) la significancia estadística se muestra en este caso con letras griegas para el grupo hembras-DST y letras latinas para los machos-DST. Muestras por grupo tratamiento  $n=6$ .



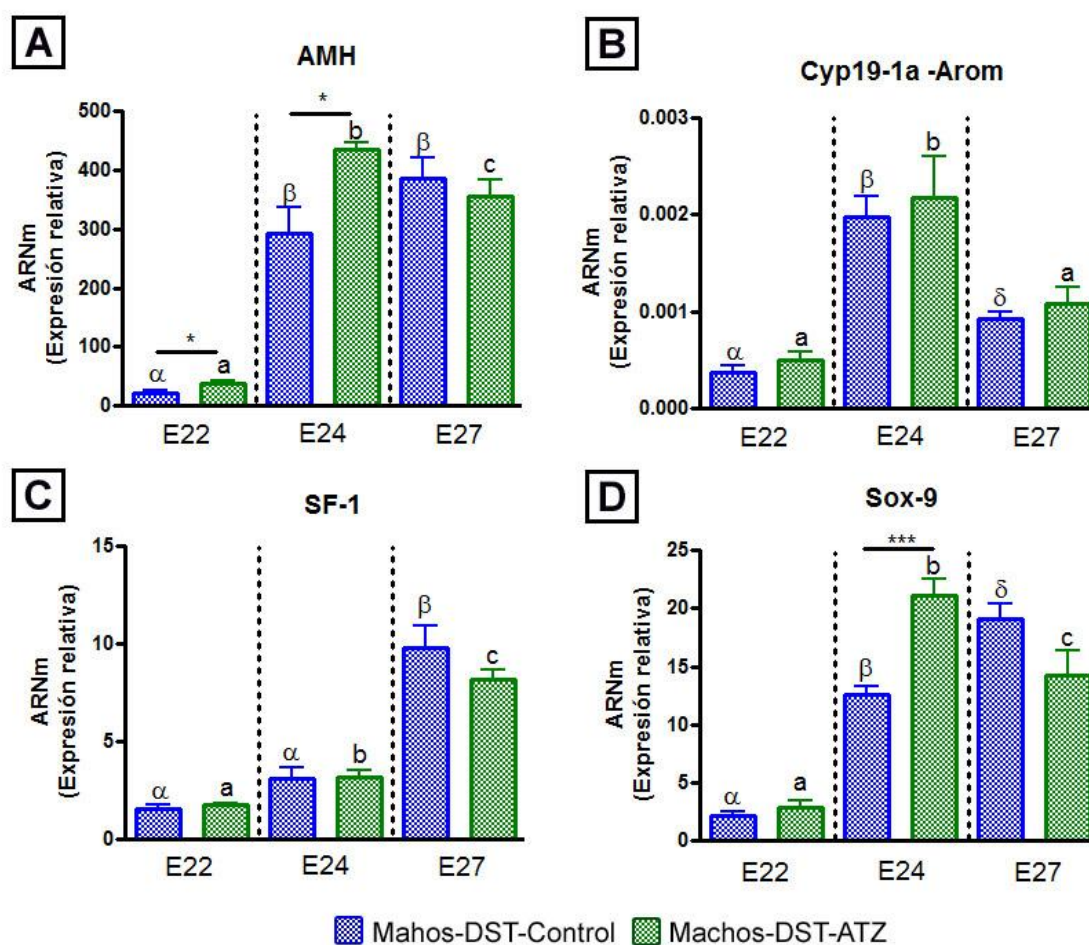
**Figura 32:** Expresión de PCNA y p63 en las gónadas embrionarias de *C. latirostris*. Cortes histológicos que muestran el patrón de inmunomarcación de PCNA y p63 en diferentes estadios embrionarios de desarrollo y en dos condiciones de incubación (a 33°C TPM+ vehículo y 33°C + 0,2 ppm de ATZ). La expresión de PCNA en machos-DST-control en las etapas 22, 24 y 27 (A-C). La expresión de PCNA en machos-DST-ATZ en las etapas 22, 24 y 27 (D-F). Expresión de p63 en machos-DST-control en las etapas 22, 24 y 27 (G-I). Expresión de p63 en machos-DST-ATZ en las etapas 22, 24 y 27 (J-L). Panel inferior: Expresiones de PCNA y p63 cuantificadas como porcentaje del área positiva. Los valores representan la media  $\pm$  SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas a  $p < 0,05$  por la prueba U de Mann-Whitney (comparando cada estadio en las condiciones de tratamiento de DST frente a DSE<sub>2</sub>) o Kruskal-Wallis seguido de la prueba de Dunn (comparando cada condición de tratamiento a lo largo de

las tres etapas estudiadas) En este caso con letras griegas para la condición hembras DST y letras latinas para machos DST. Muestras por grupo tratamiento  $n=6$ .

### 5.3.6. Micropunción y expresión génica

Utilizando el método de micropunción aislamos la porción enriquecida en gónada en todos los grupos experimentales y en los tres estadios embrionarios estudiados. Obteniendo una masa final de ARN entre 1-2  $\mu\text{g}$  por muestra ( $n=6$  por grupo experimental y por estadio), lo que nos permitió evaluar por RT-qPCR la expresión de los genes: *amh*, *cyp19a1* – aromatasa, *sf1* y *sox9*, como así también del gen constitutivo *L8* (*proteína ribosomal*). El detalle de la puesta a punto del ensayo se explicó en la sección de resultados 4.1.5.

La expresión relativa para el gen *amh* aumentó hacia el final del desarrollo en los machos-DST (estadios 24 y 27), mientras que en los machos-ATZ esta aumentó en la etapa 24 y presentó una caída en estadio 27 ( $p<0.05$ ). La expresión relativa de *amh* fue mayor en los machos-ATZ respecto a los machos-DST en los tres estadios estudiados ( $p<0.005$ ) (Fig.33A). En cuanto al gen *cyp19a1* que codifica para la enzima esteroideogénica aromatasa, su expresión relativa mantuvo el mismo patrón en los machos controles y en los expuestos a ATZ, aumentando en el estadio 24 y mostrando una caída hacia el 27 ( $p<0.05$ ). No hubo diferencias entre ambos grupos experimentales (Fig.33B). Se observó un aumento del gen *sf-1* hacia el estadio 27 en los machos-DST; mientras que en machos-ATZ aumentó la expresión del mismo, a medida que avanzó el desarrollo ( $p<0.05$ ). No se observaron diferencias entre ambos machos a lo largo de los estadios estudiados (Fig.33C). La expresión relativa de *Sox-9* aumentó a lo largo del desarrollo embrionario estudiado en machos-DST, mientras que en los machos expuestos a ATZ este gen aumentó su expresión hacia el estadio 24 y mostró una caída hacia el final del desarrollo embrionario ( $p<0.05$ ). Se observó una diferencia entre los grupos para este gen en estadio 24 siendo mayor la expresión en machos-ATZ (Fig.33D).



**Figura 33:** Expresión relativa del ARNm de los genes A: *amh*, B: *Cyp19-1a* C: *SF-1* D: *Sox-9* en las gónadas embrionarias de *C. latirostris*, Los valores representan la media  $\pm$  SEM. El *n* de muestras fue de 6 por grupo experimental y por estadio. Los asteriscos indican diferencias significativas a  $p < 0,05$  por el test t de student (comparando cada estadio en las condiciones de tratamiento machos-DST-control vs. machos-DST-ATZ) o ANOVA unidireccional seguido por la prueba de Tukey; (Comparando cada condición de tratamiento a lo largo de las tres etapas estudiadas; E22, E24 y E27) la significancia estadística se muestra en este caso con letras griegas para el grupo machos-DST y letras latinas para los machos-ATZ.

## **6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES**



### 6.1. Caracterización de la Determinación Sexual por Temperatura (DST).

En el presente apartado, evaluamos el dimorfismo sexual presente entre las gónadas femeninas y masculinas de *Caiman latirostris* obtenidas por DST, en tres etapas del desarrollo embrionario (22, 24 y 27). La evaluación de las características histo-morfológicas y la expresión de diferentes moléculas claves en el desarrollo embrionario nos permitieron ampliar el conocimiento sobre el desarrollo ovárico y testicular embrionario de esta especie. Además, demostramos que las gónadas embrionarias muestran dimorfismo sexual en la expresión proteica de los receptores de estrógenos y progesterona, así como en la expresión de la enzima aromatasa. Observamos también, dimorfismo sexual en la proliferación celular y la posible incidencia de daño del ADN en las células germinales a través de la expresión de p63 en hembras. Finalmente, en la expresión génica hallamos patrones de expresión sexualmente dimórficos en todos los genes evaluados *amh*, *sox-9* y *cyp19-a1* (aromatasa) y *sf-1*.

Tal como fue descrito por Stoker y col, [9], el crecimiento embrionario de *C. latirostris* fue más acelerado cuando la incubación fue a TPM (33°C) que a TPH (30°C). Esto había sido evaluado anteriormente en otra especie de cocodrilo, el *A. mississippiensis* [55].

Durante los estadios 22 y 24 de desarrollo embrionario, las gonadas de *C. latirostris* no presentaron claras diferencias histológicas entre machos y hembras, contrariamente a lo que fue descrito por Smith y Joss [55] para *A. mississippiensis*. Ellos evaluaron gracias al análisis ultraestructural, el agrandamiento de varias células somáticas en la médula de la gónada incubada a TPM formando presuntas células de Sertoli durante las etapas de desarrollo 21-22. También observaron la completa diferenciación de estas células pre-sertoli en células de Sertoli en estadio 24, lo que desencadenaría el inicio de la formación de los túbulos seminíferos en los aligatores machos [55]. En el último estadio estudiado, el estadio 27, encontramos una clara diferencia dimórfica entre las gónadas embrionarias de *C. latirostris*, los túbulos seminíferos en alto grado de desarrollo presente en los machos-DST y la ausencia del ducto de Müller en los mismos, muestran este claro dimorfismo sexual. Antecedentes en esta especie, mostraban un gran desarrollo de los túbulos y la ausencia de ducto en animales en día postnatal diez[9], pero esto no era conocido en etapas embrionarias.

En relación a la pérdida del ducto de Müller en machos, se ha demostrado en yacarés de 10 días de edad, que la expresión del ARNm de *amh* y *sox9* es sexualmente dimórfica, con niveles más elevados en machos que en hembras [35]. En nuestro estudio además, pudimos observar que este dimorfismo sexual es previo al nacimiento, iniciándose tan tempranamente para *amh* como es el estadio 22 de desarrollo embrionario y permaneciendo elevado su nivel de expresión hasta finales del desarrollo. Para *sox-9* la diferencia entre ambos sexos comenzó en el estadio 24 y se

extendió hasta el final. El factor de transcripción Sox-9, se ha asociado con el desarrollo de testículos en todos los vertebrados examinados hasta la fecha [34] y la regulación de este sobre *amh* es controvertida. Sox-9 parece tener un papel fundamental en los pasos iniciales de la diferenciación de células de Sertoli en ratones, sin embargo, es poco probable que realice la misma función en otros vertebrados, como pollos y cocodrilos [43,41]. De hecho, en *A. mississippiensis*, las células pre-Sertoli aparecen desde la etapa 22, aproximadamente 2 semanas antes de que se pueda detectar *sox-9* [138]. En ratones, la expresión de *sox-9* precede a la expresión de *amh* alrededor de las 24 h y es probable que *sox-9* regule directamente a *amh* [139]. En pollos y caimanes, la expresión de *amh* precede a la expresión de *sox-9* alrededor de las 24 h y 10 días, respectivamente, lo que hace altamente improbable que *sox-9* inicie la expresión de *amh*, tal como observamos en el presente trabajo. Sin embargo, tanto en pollos como en caimanes, la fuerte regulación al alza de *amh* en los machos es coincidente con el comienzo de la expresión de *sox-9*. Este hallazgo indica que aunque *sox-9* no inicia *amh* en estas especies, puede tener un papel en su posterior regulación positiva [34].

El factor esteroideogénico-1 (*Sf-1*), es un gen que se sabe, regula la expresión de las enzimas esteroideogénicas gonadales, incluida la aromatasa [37]. *Sf-1* es crítico en la determinación y diferenciación del sexo de vertebrados, independientemente del mecanismo de determinación del sexo. Más allá de sus funciones esteroideogénicas, se requiere *Sf-1* para mantenimiento de la gónada bipotencial temprana y juega un papel crítico en la diferenciación testicular. El ARNm de *Sf-1* se expresa a niveles más elevados en testículos de mamíferos en desarrollo, un patrón conservado en la tortuga deslizador [40]. *Sf-1* también responde a los tratamientos de reversión de sexo: los niveles de *Sf-1* aumentan con el cambio de temperatura y con el tratamiento de inhibición de aromatasa productora de machos, y disminuirá con el correspondiente cambio a temperatura productora de hembras y la aplicación exógena de estrógenos [140]. En las gónadas embrionarias de *C. latirostris*, en concordancia con los antecedentes mencionados, observamos dimorfismo sexual en el estadio bipotencial 22, donde la expresión de *sf-1* fue mayor en hembras, y es importante para el mantenimiento del estado bipotencial, mientras que un aumento del mismo se observó en los machos hacia el final del desarrollo, tal como sucede en la desarrollo testicular de mamíferos y que además fue descrito en una especie de tortuga [40].

Como se sabe, los estrógenos juegan un papel crítico en la determinación del sexo en cocodrilos y tortugas, como probablemente lo hacen en la mayoría de los vertebrados no mamíferos. Sin embargo, no está claro cómo los estrógenos anulan la influencia de la temperatura durante la determinación del sexo en estas especies [141]. La mayoría de los vertebrados estudiados hasta la fecha [142] tienen dos formas de receptores de estrógenos nucleares, ER $\alpha$  y ER $\beta$ , que tienen diferente especificidad de ligando, distribución y función. En *A. mississippiensis*, la evidencia

indica que ER $\alpha$  es probablemente el ER principalmente implicado en la reversión sexual así como en la supervivencia embrionaria del conducto de Müller [141]. La expresión de ER $\alpha$  en las gónadas embrionarias de *C. latirostris* no se modificó a lo largo de las etapas de desarrollo evaluadas en hembras-DST. Mientras que los machos-DST, mostraron una mayor expresión de este receptor en las etapas 22 y 24, cuando la gónada aún es bipotencial y se inicia la diferenciación. Posteriormente, la expresión de ER $\alpha$  disminuyó hacia el final del desarrollo embrionario en los machos por debajo de los niveles expresados en hembras.

Por otro lado, el receptor de progesterona (PR) se considera una molécula diana de acción estrogénica y su regulación difiere entre especies [143-145]. Se halló dimorfismo sexual para esta proteína en el estadio 22 de desarrollo embrionario gonadal de *C. latirostris*, siendo mayor en hembras-DST. En machos se observó un aumento de PR hacia el final del desarrollo, que deja entrever el papel de la TPM en el alza de esta proteína, de todos modos, como se explicará en el próximo apartado, este aumento no es significativo comparativamente con la acción que tienen los estrógenos administrados en la hembras determinadas sexualmente por E<sub>2</sub>.

La enzima que cataliza la producción de estrógenos a partir de un sustrato de andrógenos es la citocromo P450 - aromatasa [146]. Hallamos expresión proteica y del ARNm de esta enzima (*cyp19a1*) en las gonadas embrionarias de *C. latirostris*, estableciéndose una claro patrón dimorfo entre machos y hembras siendo mayor la expresión en hembras durante todo el desarrollo gonadal estudiado, tanto en la evaluación del gen como el de la proteína. Esto tiene implicancia sobre el rol clave de esta enzima en la determinación sexual hacia hembras, ya descrito para muchas especies DST. Sin embargo, estudios en otros cocodrilos (*Crocodylus porosus* y *Alligator mississippiensis*) han detectado contrariamente, que el aumento de aromatasa surge después de PTS en hembras DST [50-51]. Esta falta de expresión de la aromatasa gonadal endógena hasta el final del desarrollo llevó a la hipótesis contradictoria de que los estrógenos endógenos no están implicados en la diferenciación ovárica temprana en las especies de DST. Se propuso que los tejidos distintos de las gónadas proporcionan al sitio la sensibilidad térmica primaria, así como la fuente de estrógeno para el desarrollo ovárico temprano. De esta forma, la aromatasa sería un elemento descendente en la cascada de desarrollo de DST [52]. Para *C. porosus*, la determinación de la aromatasa se realizó mediante la evaluación de su actividad en todo el complejo de GAM, mientras que para *A. mississippiensis*, la aromatasa se ensayó mediante hibridación *in situ*. Es importante enfatizar en nuestro trabajo, la generación del anticuerpo anti-aromatasa que nos permitió evaluar la presencia de la proteína en su fuente real. La expresión diferencial de la actividad de la aromatasa ovárica (*cyp19a1*) ocurre en la gónada de tortugas en desarrollo a temperaturas de producción femenina y masculina durante el TPS de las tortugas *Emys orbicularis* [45],

*Dermochelys coriacea* [147], y *Malaclemys terrapin* [148,52]. Los experimentos y ensayos llevados a cabo en tortugas hembras utilizando gónadas aisladas, proporcionan evidencia de que las gónadas responden a los cambios de temperatura modificando su propia diferenciación sexual [53].

Los procesos de desarrollo implican la proliferación celular y diferenciación. En las gónadas embrionarias de *C. latirostris*, pudimos observar un aumento en la expresión de PCNA en machos-DST, tanto al inicio como hacia el final del desarrollo gonadal embrionario estudiado. Esto podría explicar la baja actividad proliferativa durante las etapas de desarrollo caracterizadas por una diferenciación intensa como es la etapa 24. Nuestros hallazgos están de acuerdo con los informados por Zhu y col. [149], quien afirmó que la división y diferenciación celular a menudo actúan como dos socios mutuamente excluyentes que están relacionados pero no pueden coexistir.

La proteína p63 es un factor transcripcional, miembro de la familia p53, implicado en cáncer y desarrollo. La ablación completa de todas las isoformas p63 produjo ratones con anomalías fatales del desarrollo, incluida la falta de barrera epidérmica, de extremidades y otros apéndices epidérmicos. Ratones *Knock-out* específicos para la isoforma TAp63, aunque se desarrollaron normalmente, no presentaron apoptosis inducida por daño en el ADN durante la detención meiótica del folículo primordial, lo que sugiere una participación de p63 en la reproducción materna. A su vez, se ha detectado la proteína p63 en el núcleo de los gonocitos en testículos de ratón. Durante el desarrollo del testículo en ratones se observó una fuerte expresión del ARNm y la proteína p63 $\gamma$  cuando los gonocitos se encuentran en el período quiescente [59]. Es conocido que las proteínas de unión al ADN, más precisamente las de la familia p53, poseen dominios altamente conservados que se mantienen en los distintos linajes filogénicos. p63 también se halló en la especie aviar, *Gallus domesticus*, pero constituimos, mediante nuestro trabajo y a nuestro conocimiento, el primer reporte de la presencia de p63 en una especie de reptil no aviano. Hallamos un aumento de la expresión de TAp63 en las células germinales gonadales embrionarias en estadio 24 de las hembras-DST, lo que podría relacionarse con la participación en el punto de control de la respuesta al daño del ADN de ovocitos, uno de los primeros eventos en el proceso de selección mediado por apoptosis, tal como ocurre en mamíferos [58].

En resumen, nuestros resultados muestran que estas dos condiciones de desarrollo estudiadas, 30°C (TPH) o 33°C (TPM), confirman la determinación del sexo por temperatura que presenta *C. latirostris* y además, posibilitaron establecer el dimorfismo sexual en la expresión de distintas moléculas claves asociadas con el desarrollo y la función ovárica y testicular.

Ampliando de este modo el conocimiento sobre la determinación sexual y diferenciación gonadal de esta especie a nivel embrionario.

## **6.2. Hembras: Aspectos de la Determinación Sexual por Temperatura (DST) y la Determinación sexual inducida por estrógenos (DSE<sub>2</sub>).**

En el presente apartado, evaluamos las similitudes y diferencias de las gónadas femeninas de *C. latirostris* en tres etapas del desarrollo embrionario (22, 24 y 27) obtenidas por DST y DSE<sub>2</sub>. La evaluación de las características histo-morfológicas y la expresión de diferentes moléculas claves en el desarrollo embrionario nos permitieron ampliar el conocimiento sobre el desarrollo ovárico embrionario de esta especie. Además, demostramos que las gónadas femeninas DSE<sub>2</sub> muestran alteraciones en la expresión proteica de los receptores de estrógenos y progesterona, así como en la expresión de la enzima aromatasa. Observamos también, un desequilibrio entre la proliferación celular y la apoptosis y la posible incidencia de daño del ADN en las células germinales a través de la expresión de p63 en estas hembras. Finalmente, hallamos diferencias entre estas hembras DST y DSE<sub>2</sub> en la expresión de genes claves en el desarrollo gonadal como *amh*, *sox-9* y *cyp19-a1* (aromatasa), en los estadios de desarrollo de mayor sensibilidad al ambiente.

Todo esto respalda nuestra hipótesis de que los cambios observados en los ovarios de recién nacidos y juveniles expuestos a E<sub>2</sub> antes del período termo-sensible [76], ya podrían aparecer en las primeras etapas del desarrollo embrionario.

Las hembras se obtuvieron por DST y DSE<sub>2</sub>. Se ha demostrado que la adición de estrógenos exógenos en un período sensible puede usarse para producir hembras de tortugas, lagartos y cocodrilos. Además, se ha propuesto como un método para la conservación de especies de tortugas en peligro de extinción [18,23].

Las gónadas en la etapa 22 no muestran diferencias histológicas, y el sexo aún no se ha determinado. La expresión de VASA fue una herramienta útil para identificar la ubicación de las células germinales. Esta herramienta también se ha utilizado en otras especies para el mismo propósito [134]. Las gónadas femeninas se pueden distinguir en la etapa 24, y esto se debe principalmente a la ubicación de las células germinales en grupos bien delimitados y la regresión de la médula. Smith y Joss [55] observaron un resultado similar para *Alligator mississippiensis*. Las gónadas DSE<sub>2</sub> en los estadios 24 y 27 difieren de las gónadas DST, en que las primeras poseen más celularidad y menos "espacios vacíos" en la médula [141]. No se encontraron diferencias entre DST y DSE<sub>2</sub> en la etapa 27 para *A. mississippiensis*. Contrario a nuestras observaciones, recientemente se publicó para las tortugas que el estradiol exógeno

altera el crecimiento gonadal y el período de determinación del sexo por temperatura [150]. Encontraron una proliferación celular disminuida y gónadas más pequeñas inducidas por  $E_2$  exógeno. Las diferencias observadas en las gónadas femeninas entre tortugas y cocodrilos podrían deberse a la temperatura (para las tortugas, la temperatura de producción masculina es de aproximadamente 26°C mientras que las hembras se producen a una temperatura de aproximadamente 33°C, el patrón inverso a *C. latirostris*). Además, para los caimanes se demostró que el crecimiento es más acelerado a 33°C [9]. Por lo tanto, es posible que la mayor celularidad observada en las gónadas femeninas obtenidas por  $DSE_2$  pueda estar influenciada por este desarrollo acelerado.

Antecedentes en hembras de *C. latirostris* DST y  $DSE_2$  demuestran cambios en la expresión génica de *sox-9* en día postnatal 10, en un estudio realizado sobre todo el complejo GAM; mostrando una mayor expresión del ARNm de *sox-9* en las hembras  $DSE_2$ , sin observarse diferencias para *amh* y *sf-1*[35]. En embriones en cambio, evaluamos que la adición de estrógenos previo al PTS disminuyó la expresión del ARNm de *amh* gonadal en las hembras –  $DSE_2$  por debajo del nivel establecido para las DST, durante el estadio bipotencial 22 y el 24. Por otra parte, el gen *sox-9* aumentó su expresión en las hembras- $DSE_2$  por encima de las hembras-DST en el estadio 24, y posterior a esto, se vio un alza en la expresión de *amh*, en el estadio 27, al nivel de las hembras-DST, esto hace pensar en que la temperatura puede hacer su efecto sobre *sox-9* y este sobre *amh*, regulación ya establecida para *A. mississippiensis* incubados a TPM [138].

Los estrógenos actúan principalmente a través de sus receptores específicos y los niveles de expresión del receptor pueden reflejar la sensibilidad de un órgano/tejido a estos esteroides [24-25]. La expresión de  $ER\alpha$  en las gónadas de *C. latirostris* no se modificó a lo largo de las etapas de desarrollo evaluadas en las hembras DST. El grupo  $DSE_2$  sin embargo, mostró una mayor expresión de este receptor en la etapa 22, cuando la gónada aún es bipotencial, mientras que hacia el final del desarrollo embrionario, la expresión disminuyó, lo que sugiere una clara regulación negativa de  $ER\alpha$  en las hembras  $DSE_2$ .

Por otra parte, el receptor de progesterona, mostró una expresión muy baja en las primeras etapas estudiadas en las gónadas femeninas DST y  $DSE_2$ , pero en la etapa 27, se observó un gran aumento de la expresión de este receptor en las gónadas  $DSE_2$ . La acción de los estrógenos, de manera incipiente, podría producir tanto la regulación negativa de  $ER\alpha$  como la estimulación de PR al igual que en el tracto reproductivo femenino de mamíferos y especies aviares [151-153]. El mismo patrón de resultados se observa en las gónadas embrionarias de las hembras- $DSE_2$ .

Al observar una clara acción de los estrógenos en las hembras-DSE<sub>2</sub>, es pertinente pensar acerca del origen de esas hormonas ¿Será la única dosis de E<sub>2</sub> administrada a los huevos de *C. latirostris* previo al PTS, la causante de tal respuesta estrogénica, ó más aún, la producción de estrógenos gonadales estará aumentada? La citocromo p450- aromatasa es la enzima clave para la producción de estrógenos a partir de los andrógenos[44]. Al analizar su expresión en las gónadas embrionarias de las hembras DST y DSE<sub>2</sub>, observamos el mismo patrón de expresión de aromatasa durante el desarrollo, pero aproximadamente tres veces mayor para DSE<sub>2</sub>. Este patrón se caracterizó por una alta expresión de aromatasa desde el período de determinación del sexo con una caída hacia de la etapa 27. Está documentado en larvas de pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) a temperatura de producción masculina, que el tratamiento E<sub>2</sub> causó un marcado aumento en la expresión de *cyp19a1* [154]. Coincidentemente, nuestros resultados de expresión génica muestran un aumento de *cyp19a1* en la gónada embrionaria DSE<sub>2</sub> durante los estadios críticos para la determinación y diferenciación gonadal evaluados. Tal como ya fue documentado por Pieau y Dorizzi [53], las gónadas responden a los cambios de temperatura modificando su propia diferenciación sexual, los estrógenos son sintetizados por las gónadas femeninas morfológicamente indiferenciadas en las ranas [155]. Gohin y col. [54] informaron que la expresión de aromatasa en ovocitos de *Xenopus laevis* adulto participa significativamente en la síntesis de estrógenos ováricos, lo que sugiere una característica común de los vertebrados vitelogénicos. También observamos que las células germinales expresan aromatasa en embriones de *C. latirostris*.

Para obtener una población sana de ovocitos en la edad adulta, durante el proceso de diferenciación gonadal femenina, las células germinales presentan proliferación, meiosis y apoptosis. Observamos una alta proliferación gonadal en hembras DSE<sub>2</sub> al comienzo de PTS seguido de una caída en etapas posteriores. No se observaron modificaciones en la proliferación de gónadas femeninas DST durante el desarrollo. Nuestros hallazgos están de acuerdo con los informados por Zhu et al. [149], donde la división y diferenciación celular no coexisten. Un aumento en la proliferación de células germinales podría ser la característica definitoria de la determinación de las hembras como se ve en los caimanes [55].

No está claro si la apoptosis de células germinales está involucrada en el desarrollo gonadal y la diferenciación sexual en especies DST. En las gónadas de las larvas de *Odontesthes bonariensis* durante la diferenciación sexual, el ensayo TUNEL reveló señales apoptóticas generalizadas a temperaturas de producción masculinas, pero prácticamente ninguna a hembras producidas por temperaturas, lo que sugiere que la apoptosis gonadal puede tener un papel importante [56]. Numerosos estudios muestran que los estrógenos son reguladores supresores de la apoptosis ovárica que actúan para garantizar la supervivencia de los folículos pre-ovulatorios en los

vertebrados (revisado en [56]). En nuestro estudio, el ensayo TUNEL mostró en hembras DST, niveles bajos de apoptosis en las etapas 22 y 24 con un aumento significativo en la etapa 27. De esta manera, la apoptosis no estaría relacionada con la determinación del sexo en las hembras control. Dado que existe una clara relación de la apoptosis con el remodelado de células germinales para el inicio de la formación del folículo, (revisado en [57]) hemos planteado la hipótesis de que el aumento de la apoptosis en la etapa 27 en hembras DST está relacionado con este mecanismo. En las hembras DSE<sub>2</sub>, la apoptosis mostró un pico en la etapa 24. Se podría suponer que este mecanismo podría estar relacionado con la determinación del sexo en DSE<sub>2</sub>. Además, proponemos que este resultado podría estar relacionado con la expresión de p63 en las células germinales.

Se sabe que la familia p53 ha estado implicada en las vías por las cuales algunas células sufren apoptosis. La isoforma TAp63 es el único miembro de la familia p53 que participa en el punto de control de la respuesta al daño del ADN de ovocitos en mamíferos, uno de los primeros eventos en el proceso de selección mediado por apoptosis [58]. Detectamos inmunorreactividad de TAp63 específica en células germinales de embriones de yacaré (co-localización VASA / p63), y se mantiene baja durante todo el desarrollo en hembras DST. Mientras tanto, en las hembras DSE<sub>2</sub>, se observó un aumento en la etapa 24, lo que podría ser responsable de la mayor apoptosis observada en esta etapa. La expresión más alta de TAp63 implicaría un aumento del daño del ADN de las células germinales en las gónadas de las hembras DSE<sub>2</sub>. En este sentido, podría esperarse un aumento de la muerte apoptótica de las células germinales.

Resultados previos de nuestro grupo encontraron una alteración en la dinámica folicular en hembras DSE<sub>2</sub> neonatales [76]. Además, las hembras DSE<sub>2</sub> juveniles de la misma especie exhibieron una mayor incidencia de folículos multiovulares [76]. Aunque se desconoce el mecanismo por el cual se desarrollan los folículos multiovulares, se postula que es una consecuencia de los grupos de ovocitos que no se separaron y se encerraron individualmente en un folículo [156]. Hipotetizamos, que el desequilibrio entre la proliferación /apoptosis observada en las hembras DSE<sub>2</sub> podrían ser la causa de estas diferencias observadas.

En resumen, nuestros resultados muestran que en las dos condiciones de desarrollo estudiadas, 30°C o 33°C+ E<sub>2</sub> 1.4 ppm aplicados tópicamente en la etapa embrionaria 20, pueden producir hembras fenotípicas, en *C. latirostris*. Sin embargo, esos ovarios son diferentes entre sí, exhibiendo distintos patrones de expresión de moléculas claves asociadas con el desarrollo y la función ovárica. Es importante destacar que los cambios demostrados en embriones hembras-DSE<sub>2</sub> reflejan la idea de que los compuestos ambientales con actividad estrogénica comprobada



podrían alterar la funcionalidad ovárica de *C. latirostris* adulto, poniendo en peligro su salud reproductiva y el equilibrio de las poblaciones silvestres en el ecosistema.

### **6.3. Machos: Efectos de la exposición *in ovo* a Atrazina sobre la Determinación Sexual de *Caiman latirostris*.**

Durante este último apartado, nos enfocaremos en describir los cambios observados en las gónadas embrionarias masculinas de *C. latirostris* tratadas con una dosis ambientalmente relevante (0,2 ppm) de uno de los herbicidas más utilizados a nivel mundial, la atrazina. Para ello compararemos estas gónadas tratadas (machos-DST-ATZ) con las que han sido determinadas sexualmente por temperatura, que establecería la condición control (machos-DST-control). Con el objetivo de evaluar la acción de una sustancia con probada acción perturbadora endocrina, sobre las gónadas masculinas de *C. latirostris*, fue que encontramos modificaciones tanto en la histoarquitectura testicular embrionaria, como en las moléculas claves del desarrollo gonadal, tanto a nivel proteico como a nivel génico, dos genes netamente vinculados a la diferenciación gonadal hacia testículo: *amh* y *sox-9*, se vieron modificados por la acción de atrazina.

*C. latirostris* es considerada una especie con características eco-fisiológicas que la sitúan como una especie potencial centinela de contaminación ambiental [92,67,111,84-85]. La manera de establecer la acción de un PE es a través de biomarcadores [95]. Al evaluar las características histomorfológicas de las gónadas embrionarias del yacaré, consideradas estas como un biomarcador, no observamos cambios entre los grupos en las primeras etapas de desarrollo estudiadas. Hacia finales del desarrollo, en estadio 27, si bien a nivel macroscópico se pudo observar la ausencia de ducto de Müller y la morfología aparentemente normal de los testículos, se encontraron túbulos seminíferos tortuosos con aparente incremento de la luz luminal en machos expuestos a ATZ. Resultados similares se habían obtenido para *C. latirostris* en etapa postnatal [111], pero se desconocía la existencia de efectos en etapas tan tempranas como el desarrollo embrionario. Este efecto gonotóxico de la atrazina ya ha sido descripto además, en una variedad de especies, entre ellos: peces, donde causa la degeneración del tejido intersticial en los testículos [109], anfibios[110], reptiles [111]y mamíferos [113,112]. La exposición a la atrazina en estas clases de vertebrados produce aumentos en el tamaño de los túbulos seminíferos, pérdida de células de Sertoli y una marcada pérdida de células germinales[110,113,111-112]

Al analizar los biomarcadores de la vía estrogénica, vía que podría estar implicada en la acción perturbadora endocrina de la atrazina, observamos una menor expresión del RE $\alpha$  en los machos-ATZ respecto a los controles en estadio 24, pero un resultado aún más sorprendente, fue hallar

una caída a lo largo del desarrollo embrionario estudiado en los machos expuestos al herbicida, mostrando una clara regulación negativa de este receptor. Además, se ha observado mediante un ensayo *in vitro* que atrazina compite por receptores de estrógeno presentes en oviducto de *A. mississippiensis*, lo cual podría evidenciar su capacidad para actuar como xenoestrógeno [157]. A su vez, se podría sospechar que un aumento de los estrógenos regule negativamente al RE $\alpha$  en las gónadas embrionarias de los machos-ATZ en *C. latirostris*. En relación a esto, varios estudios, sugieren que la atrazina aumenta la síntesis de estrógenos. La atrazina induce aromatasa en las gónadas de peces, anfibios [110] y reptiles (*in vitro*) [16], y en líneas celulares humanas. Además, la atrazina aumenta los estrógenos circulantes en peces [109], anfibios [110] y en mamíferos (ratas de laboratorio). Los estrógenos inducen la feminización parcial y completa en peces, anfibios y reptiles, por lo que la inducción de aromatasa y los aumentos posteriores en la síntesis de estrógenos representan un mecanismo plausible para los efectos de la feminización.

Cuando evaluamos la expresión de la enzima aromatasa en la gónada embrionaria de *C. latirostris*, hallamos un aumento de la expresión de dicha proteína en los machos-ATZ, respecto a los controles, en los tres estadios de desarrollo evaluados. Esto sugeriría una mayor producción de estrógenos en la gónada masculina, lo cual va en consonancia con los antecedentes recientemente mencionados y explicaría la regulación en baja del RE $\alpha$ . El gen *cyp19-a1*, sin embargo no mostró diferencia significativa en los machos-ATZ con respecto a los controles, pero sí una leve tendencia al aumento en los machos tratados, en todos los estadios embrionarios evaluados, lo que sugiere que pequeñas modificaciones de este ARNm podrían tener efecto sobre la expresión de la proteína a nivel gonadal.

La proliferación celular y en daño en el ADN de células germinales, también son considerados biomarcadores a la hora de evaluar un compuesto como PE. En este sentido al evaluar la expresión de PCNA en las gónadas embrionarias de *C. latirostris*, observamos un aumento de la proliferación celular en el estadio bipotencial 22 de los machos-ATZ, con respecto a los controles. Por otra parte, detectamos inmunorreactividad específica de TAp63 en células germinales de embriones de yacaré (co-localización VASA / p63), esta molécula se vio en alza en las gónadas de machos-ATZ durante el estadio 24. Esto sugiere un mayor daño en el ADN de las células germinales, en este estadio en el que se la diferenciación se inicia, pudiendo relacionarse con el aumento en la tasa proliferativa observado en estos machos en el estadio 22, que podría conllevar errores en el ensamblado de la doble hélice. Lo que podría ser detectado por p63 y en caso de no poder resolver el error, esa célula ira indefectiblemente a apoptosis [58], remarcando el efecto gonotóxico de la atrazina.

Todos los genes evaluados en las gónadas embrionarias de *C. latirostris* mantuvieron el mismo patrón de expresión entre machos controles y machos expuestos a una dosis ambientalmente relevante de atrazina previo al PTS. Sin embargo, la ATZ modificó dos genes claves en el desarrollo del testículo, *amh* y *sox-9*. Para *sox-9* el resultado fue similar al generado por las hembras-DSE<sub>2</sub> que mostraban un aumento de este gen en etapa 24, sin embargo *amh* a diferencia de lo que ocurría en las hembras; en los machos-ATZ, se halló aumentada respecto a los machos controles desde el estadio 22. Esta regulación resultó en la ausencia efectiva del ducto de Müller en estos machos ya en la etapa 27.

En resumen, todos los efectos generados por la administración vía tópica, de una dosis ambientalmente relevante de atrazina, durante el estadio 20 de desarrollo embrionario, sobre la diferenciación de la gónada masculina de *C. latirostris*, refuerzan la acción perturbadora endocrina ya comprobada de la atrazina, feminizando los tejidos reproductores masculinos. En yacarés pudimos describir el aumento de la expresión de aromatasa gonadal, modificando de este modo, moléculas de la vía estrogénica, alterando la proliferación celular lo que podría llevar a mayor daño en el ADN de células germinales, sumado a una alteración en genes claves para el normal desarrollo del testículo y finalmente visualizándose en alteraciones de los túbulos seminíferos a nivel histológico, ya en etapas tan tempranas como las del desarrollo embrionario. Esto es especialmente significativo en términos del impacto que la atrazina ambiental podría tener sobre el desarrollo y la reproducción de *C. latirostris* y tal vez sobre otras especies de vida silvestre.

Los resultados presentados en esta tesis apoyan y extienden los datos de la literatura, ampliando el conocimiento sobre el desarrollo ovárico y testicular embrionario de *C. latirostris*, demostrando a su vez, efectos de la exposición prenatal a contaminantes PE, durante el desarrollo embrionario. Estos resultados nos permiten elaborar las siguientes conclusiones:

- Se confirmó tanto la determinación sexual por temperatura, como la determinación sexual inducida por estrógenos en *C. latirostris*, ambas establecidas para esta especie. En el primer caso, se estableció un claro dimorfismo sexual entre las diferentes temperaturas de incubación de los huevos a TPH y TPM a diferentes niveles organizacionales, desde la expresión de genes claves para la determinación sexual hasta la histo-morfología gonadal diferencial. Mientras que en el segundo caso, la adición de 1,4 ppm de 17- $\beta$ -estradiol previo al PTS generó estructuras ováricas. Sin embargo, estas estructuras difieren tanto a nivel génico, como proteico e histológico, de las correspondientes gónadas de hembras DST.

- Las dosis utilizadas de E<sub>2</sub> y ATZ topicadas *in ovo* permitieron un normal desarrollo embrionario sin alterar el *timing* del mismo.
- Los *endpoints* evaluados fueron de gran utilidad para valorar la acción estrogénica de los compuestos probados, generando biomarcadores que permiten monitorear contaminación por xenoestrógenos en *C. latirostris*.
- La descripción ontogenética del desarrollo embrionario de *C. latirostris* logrado en este trabajo, donde se pueden observar las modificaciones en la expresión de moléculas claves de la gonadogénesis a lo largo de todo ese período, genera un aporte significativo al estudio de la biología del desarrollo reproductivo de esta especie.
- La dosis ecológicamente relevante de ATZ administrada vía tópica previo al PTS, modificó las gónadas embrionarias en machos de *C. latirostris*, alterando la expresión de genes íntimamente implicados en el desarrollo testicular como *amh* y *sox-9*; como así también, la expresión de proteínas implicadas en la vía estrogénica, la proliferación celular y la mayor incidencia de daño del ADN de células germinales. Todo ello, finalmente se vio plasmado en modificaciones a nivel histo-morfológico del testículo embrionario.

Antecedentes en animales postnatales de *C. latirostris*, demuestran alteraciones en la morfología de los túbulos seminíferos en animales expuestos *in ovo* a ATZ, como así también alteración en la dinámica folicular en hembras DSE<sub>2</sub> neonatales y una mayor incidencia de folículos multiovulares en hembras DSE<sub>2</sub> juveniles. Nuestras observaciones, realizadas durante el desarrollo embrionario, indican que los efectos sobre el desarrollo gonadal se dan en forma temprana y se perpetúan a lo largo del desarrollo, hasta la adultez.

Estos resultados evidencian que, tanto la acción estrogénica característica del E<sub>2</sub>, como la acción perturbadora endocrina de la ATZ a nivel gonadal, podrían alterar la funcionalidad ovárica y testicular de *C. latirostris*, reflejando una potencial caída de la capacidad reproductiva durante la adultez. Esto a su vez alerta sobre las posibles consecuencias ecológicas para la fauna expuesta a concentraciones ambientales de éste u otros xenoestrógenos.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**

- [1] D Warner (2011), 1 Sex determination in reptiles. , En: *Hormones and Reproduction of Vertebrates.*, (Ed: D Norris, K Lopez), Elsevier Inc, San Diego, CA, p. 1-38.
- [2] JR Lacadena (1996), *Citogenética*, Editorial Complutense, Madrid.
- [3] SF Gilbert (2005), *Biología del desarrollo*, Editorial Médica Panamericana.
- [4] T Gamble, D Zarkower (2012) Sex determination. *Curr Biol* 22 (8):R257-262.
- [5] N Valenzuela, D Badenhorst, EE Montiel, R Literman (2014) Molecular cytogenetic search for cryptic sex chromosomes in painted turtles *Chrysemys picta*. *Cytogenet Genome Res* 144 (1):39-46.
- [6] C Pieau, M Dorizzi (1981) Determination of Temperature Sensitive Stages for Sexual Differentiation of the Gonads in Embryos of The Turtle, *Emys orbicularis*. *J Morphol* 170:373-382.
- [7] MV Parachú Marcó, P Leiva, JL Iungman, MS Simoncini, CI Piña (2017) New evidence characterizing Temperature-dependent Sex Determination in Broad-snouted caiman, *Caiman latirostris*. *Herpetol Conserv and Biology* 12:78-84.
- [8] CI Pina, A Larriera, MR Cabrera (2003) Effect of Incubation Temperature on Incubation Period, Sex Ratio, Hatching Success, and Survivorship in *Caiman latirostris* (Crocodylia, Alligatoridae). *Journal of Herpetology* 37:199-202.
- [9] C Stoker, F Rey, H Rodriguez, JG Ramos, P Sirosky, A Larriera, EH Luque, M Munoz-de-Toro (2003) Sex reversal effects on *Caiman latirostris* exposed to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol A. *Gen Comp Endocrinol* 133 (3):287-296.
- [10] J Lang, H Andrews (1994) Temperature-dependent sex determination in crocodilians. *J Exp Zool* 270:28-44.
- [11] M Ferguson, T Joanen (1983) Temperature-dependent sex determination in *Alligator mississippiensis*. *Journal of Zoology* 200:143-177.
- [12] S Gilbert (2000), 17 Environmental Sex Determination, En: *Developmental Biology.* , Sinauer Associates, Sunderland (MA).
- [13] D Crews, AR Cantu, T Rhen, R Vohra (1996) The relative effectiveness of estrone, estradiol-17 beta, and estriol in sex reversal in the red-eared slider (*Trachemys scripta*), a turtle with temperature-dependent sex determination. *Gen Comp Endocrinol* 102 (3):317-326.
- [14] PC Sereno (1999) The evolution of dinosaurs. *Science* 284 (5423):2137-2147.
- [15] D Miller, J Summers, S Silber (2004) Environmental versus genetic sex determination: a possible factor in dinosaur extinction? *Fertil Steril* 81 (4):954-964.
- [16] DA Crain, LJ Guillette, Jr., AA Rooney, DB Pickford (1997) Alterations in steroidogenesis in alligators (*Alligator mississippiensis*) exposed naturally and experimentally to environmental contaminants. *Environ Health Perspect* 105 (5):528-533.
- [17] MR Milnes, Jr., RN Roberts, LJ Guillette, Jr. (2002) Effects of incubation temperature and estrogen exposure on aromatase activity in the brain and gonads of embryonic alligators. *Environ Health Perspect* 110 Suppl 3:393-396.
- [18] D Crews, JJ Bull, T Wibbels (1991) Estrogen and sex reversal in turtles: a dose-dependent phenomenon. *Gen Comp Endocrinol* 81 (3):357-364.
- [19] CE Holleley, SD Sarre, D O'Meally, A Georges (2016) Sex Reversal in Reptiles: Reproductive Oddity or Powerful Driver of Evolutionary Change? *Sex Dev* 10 (5-6):279-287.
- [20] A Tousignant, D Crews (1994) Effect of exogenous estradiol applied at different embryonic stages on sex determination, growth, and mortality in the leopard gecko (*Eublepharis macularius*). *J Exp Zool* 268 (1):17-21.

- [21] T Wibbels, JJ Bull, D Crews (1991) Chronology and morphology of temperature-dependent sex determination. *J Exp Zool* 260 (3):371-381.
- [22] T Wibbels, JJ Bull, D Crews (1992) Steroid hormone-induced male sex determination in an amniotic vertebrate. *J Exp Zool* 262 (4):454-457.
- [23] D Crews, T Wibbels (1993) *Method for preferential production of females turtles, lizards and crocodiles*. United States Patent,
- [24] T Iguchi, H Watanabe, Y Katsu (2006) Application of ecotoxicogenomics for studying endocrine disruption in vertebrates and invertebrates. *Environ Health Perspect* 114 Suppl 1:101-105.
- [25] JA McLachlan (2001) Environmental signaling: what embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals. *Endocr Rev* 22 (3):319-341.
- [26] E Willingham, D Crews (1999) Sex reversal effects of environmentally relevant xenobiotic concentrations on the red-eared slider turtle, a species with temperature-dependent sex determination. *Gen Comp Endocrinol* 113 (3):429-435.
- [27] P Koopman, J Gubbay, N Vivian, P Goodfellow, R Lovell-Badge (1991) Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 351 (6322):117-121.
- [28] BB Parrott, JA Bowden, S Kohno, JA Cloy-McCoy, MD Hale, JT Bangma, TR Rainwater, PM Wilkinson, JR Kucklick, LJ Guillette, Jr. (2014) Influence of tissue, age, and environmental quality on DNA methylation in Alligator mississippiensis. *Reproduction* 147 (4):503-513.
- [29] Y Matsumoto, D Crews (2012) Molecular mechanisms of temperature-dependent sex determination in the context of ecological developmental biology. *Mol Cell Endocrinol* 354 (1-2):103-110.
- [30] BA Mizoguchi, N Valenzuela (2016) Ecotoxicological Perspectives of Sex Determination. *Sex Dev* 10 (1):45-57.
- [31] T Rhen, A Schroeder (2010) Molecular mechanisms of sex determination in reptiles. *Sex Dev* 4 (1-2):16-28.
- [32] H Prior, M Walter (1996) SOX genes: architects of development. *Molecular Medicine* ( 2 ):405-412.
- [33] E Wright, MR Hargrave, J Christiansen, L Cooper, J Kun, T Evans, U Gangadharan, A Greenfield, P Koopman (1995) The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nat Genet* 9 (1):15-20.
- [34] BC Morrish, AH Sinclair (2002) Vertebrate sex determination: many means to an end. *Reproduction* 124 (4):447-457.
- [35] M Durando, L Cocito, HA Rodriguez, J Varayoud, JG Ramos, EH Luque, M Munoz-de-Toro (2013) Neonatal expression of amh, sox9 and sf-1 mRNA in Caiman latirostris and effects of in ovo exposure to endocrine disrupting chemicals. *Gen Comp Endocrinol* 191:31-38.
- [36] J Achermann, M Ito, P Hindmarsh, J JL (1999) A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans. *Nature Genetics* ( 22):125-126.
- [37] K Parker, B Schimmer (1997) Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. *Endocrine Reviews* (18 ):361-377.
- [38] P de Santa Barbara, N Bonneaud, B Boizet, M Desclozeaux, B Moniot, P Sudbeck, G Scherer, F Poulat, P Berta (1998) Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Müllerian hormone gene. *Mol and Cell Biol* (18 ): 6653-6665.

- [39] PA Crawford, C Dorn, Y Sadovsky, J Milbrandt (1998) Nuclear receptor DAX-1 recruits nuclear receptor corepressor N-CoR to steroidogenic factor 1. *Mol Cell Biol* 18 (5):2949-2956.
- [40] A Fleming, T Wibbels, JK Skipper, D Crews (1999) Developmental expression of steroidogenic factor 1 in a turtle with temperature-dependent sex determination. *Gen Comp Endocrinol* 116 (3):336-346.
- [41] PS Western, JL Harry, JA Marshall Graves, AH Sinclair (2000) Temperature-dependent sex determination in the American alligator: expression of SF1, WT1 and DAX1 during gonadogenesis. *Gene* 241 (2):223-232.
- [42] CA Smith, MJ Smith, AH Sinclair (1999) Gene expression during gonadogenesis in the chicken embryo. *Gene* 234 (2):395-402.
- [43] CA Smith, MJ Smith, AH Sinclair (1999) Expression of chicken steroidogenic factor-1 during gonadal sex differentiation. *Gen Comp Endocrinol* 113 (2):187-196.
- [44] HH Yao, B Capel (2005) Temperature, genes, and sex: a comparative view of sex determination in *Trachemys scripta* and *Mus musculus*. *J Biochem* 138 (1):5-12.
- [45] G Desvages, C Pieau (1992) Aromatase activity in gonads of turtle embryos as a function of the incubation temperature of eggs. *J Steroid Biochem Mol Biol* 41 (3-8):851-853.
- [46] M Ramsey, D Crews (2007) Steroid signaling system responds differently to temperature and hormone manipulation in the red-eared slider turtle (*Trachemys scripta elegans*), a reptile with temperature-dependent sex determination. *Sex Dev* 1 (3):181-196.
- [47] VA Lance, MH Bogart (1992) Disruption of ovarian development in alligator embryos treated with an aromatase inhibitor. *Gen Comp Endocrinol* 86 (1):59-71.
- [48] M Dorizzi, N Richard-Mercier, G Desvages, M Girondot, C Pieau (1994) Masculinization of gonads by aromatase inhibitors in a turtle with temperature-dependent sex determination. *Differentiation* 58:1-8.
- [49] A Elbrecht, RG Smith (1992) Aromatase enzyme activity and sex determination in chickens. *Science* 255 (5043):467-470.
- [50] WN Gabriel, B Blumberg, S Sutton, AR Place, VA Lance (2001) Alligator aromatase cDNA sequence and its expression in embryos at male and female incubation temperatures. *J Exp Zool* 290 (5):439-448.
- [51] CA Smith, JM Joss (1994) Steroidogenic enzyme activity and ovarian differentiation in the saltwater crocodile, *Crocodylus porosus*. *Gen Comp Endocrinol* 93 (2):232-245.
- [52] N Valenzuela, T Shikano (2007) Embryological ontogeny of aromatase gene expression in *Chrysemys picta* and *Apalone mutica* turtles: comparative patterns within and across temperature-dependent and genotypic sex-determining mechanisms. *Dev Genes Evol* 217 (1):55-62.
- [53] C Pieau, M Dorizzi (2004) Oestrogens and temperature-dependent sex determination in reptiles: all is in the gonads. *J Endocrinol* 181 (3):367-377.
- [54] M Gohin, P Bodinier, A Fostier, J Bobe, F Chesnel (2011) Aromatase expression in *Xenopus* oocytes: a three cell-type model for the ovarian estradiol synthesis. *J Mol Endocrinol* 47 (2):241-250.
- [55] C Smith, J Joss (1993) Gonadal sex differentiation in Alligator mississippiensis, a species with temperature-dependent sex determination. *Cell and Tissue Research* 273:149-162.



- [56] Y Yamamoto, RS Hattori, A Kitahara, H Kimura, M Yamashita, CA Strussmann (2013) Thermal and endocrine regulation of gonadal apoptosis during sex differentiation in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Sex Dev* 7 (6):316-324.
- [57] YC Sun, XF Sun, PW Dyce, W Shen, H Chen (2017) The role of germ cell loss during primordial follicle assembly: a review of current advances. *Int J Biol Sci* 13 (4):449-457.
- [58] J Carroll, P Marangos (2013) The DNA damage response in mammalian oocytes. *Front Genet* 4:117.
- [59] B Petre-Lazar, G Livera, SG Moreno, E Trautmann, C Duquenne, V Hanoux, R Habert, H Coffigny (2007) The role of p63 in germ cell apoptosis in the developing testis. *J Cell Physiol* 210 (1):87-98.
- [60] D Uchida, M Yamashita, T Kitano, T Iguchi (2002) Oocyte apoptosis during the transition from ovary-like tissue to testes during sex differentiation of juvenile zebrafish. *J Exp Biol* 205 (Pt 6):711-718.
- [61] T Waller, P Micucci (1992) Relevamiento de la Distribución, Hábitat y Abundancia de los Crocodilos de la República Argentina. Fase I (1990/91): .61.
- [62] A Larriera, A Imhof (2000) Proyecto yacaré, Santa Fe, Argentina: a sustainable use proposal. *Crocodiles. Proceedings of the 15th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group, IUCN*:311-313.
- [63] MA Freiberg, AL Carvalho (1985) El yacaré sudamericano *Caiman latirostris* *Physis* 25:351-360.
- [64] SA Santos, MS Nogueira, MS Pinheiro (1996) Diets of *Caiman crocodilus* yacare from different habitats in the Brazilian Pantanal. *Herpetological J* 6:111-117.
- [65] CITES *Convencion Sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre*. <http://www.cites.org/esp/app/index.php>. Accessed 03- 11 2017
- [66] WS Prado, CI Piña, T Waller (2012) categorización del estado de conservación de los caimanes (yacarés) de la República Argentina. *Cuad Herpetol* 26:403-410.
- [67] G Poletta, A Larriera, P Siroski, M Mudry, E Kleinsorge (2009), Effects of chemical contaminants on wildlife: identification of biomarkers in a sentinel species. , En: *Wildlife: Destruction, Conservation and Biodiversity*, (Ed: J Harris, P Brown), Nova Science Publishers, USA, p. 1-20.
- [68] P Micucci, T Waller (1995), Los yacare de Argentina: Hacia un aprovechamiento sustentable., En: *La Conservación y el Manejo de Caimanes y Cocodrilos de América Latina*, (Ed: AyLMV Larriera), Fundación Banco Bica, Santo Tomé, Santa Fe, Argentina., p. 81-112.
- [69] LM Verdade (1997) *Morphometric Analysis of the broad-snouted Caiman (Caiman latirostris): an assessment of individual's clutch, body size, sex, age, and area of origin.*, Gainesville, Florida, USA
- [70] WS Prado (2003) *Estado de conservación y aspectos poblacionales de los yacarés overo Caiman latirostris (DAUDÍN, 1802) y negro Caiman yacaré (DAUDÍN, 1802) en relación a su hábitat en el Chaco oriental.*, Universidad CAECE, Buenos Aires
- [71] MS Simoncini, FB Cruz, CI Piña (2013) Effects of enviromental temperature on the onset and the duration of oviposition period of *Caiman latirostris*. . *Herpetol Conserv Biol* 8:409-418.
- [72] LM Verdade (1995), Biología reproductiva do jacaré-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*) em Sao Paulo, Brasil., En: *La conservación y el manejo de los caimanes y cocodrilos en America Latina*, (Ed: A Larriera, L Verdade, Santa Fe, Argentina, p. 57-79.

- [73] AA Yanosky, C Mercolli (1995), *Caiman latirostris* y *Caiman yacare* en la reserva ecológica El Bagual (Formosa, Argentina). En: *La conservación y el manejo de los caimanes y cocodrilos de América Latina.*, (Ed: A Larriera, L Verdade, Santa Fe, Argentina.
- [74] C Piña, A Larriera, M Cabrera (2003) The effect of incubation temperature on hatching success, incubation period, survivorship and sex ratio in *Caiman latirostris* (Crocodylia, Alligatoridae). *J of Herpet* 37: 199-202.
- [75] C Piña, A Imhof, N Frutos, M Medina, A Larriera (2002), Tamaño de postura y medidas de huevos de *Caiman latirostris* en las provincias de Santa Fe y Entre Ríos. , En: *La Conservación y el Manejo de Caimanes y Cocodrilos de América Latina.*, (Ed: L Verdade, A Larriera), Piracicaba, São Paulo, Brasil., p. 127-134.
- [76] C Stoker, PM Beldomenico, VL Bosquiazzo, MA Zayas, F Rey, H Rodriguez, M Munoz-de-Toro, EH Luque (2008) Developmental exposure to endocrine disruptor chemicals alters follicular dynamics and steroid levels in *Caiman latirostris*. *Gen Comp Endocrinol* 156 (3):603-612.
- [77] C Piña, P Donayo ( 2000) Temperature sex determination on *Caiman latirostris* . *Proceedings of the 15 th Working Meeting of the CSG IUCN - The World Conservation Union*:505-510.
- [78] A Larriera, C Piña (2000) *Caiman latirostris* (broad-snouted caiman) nest predation: does low rainfall facilitate predator access? *Herpetological Natural History* 7:73-77.
- [79] T Colborn, FS vom Saal, AM Soto (1993) Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect* 101 (5):378-384.
- [80] EPA (1997) Special report on environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis. .EPA/630/R-696/012.
- [81] RT Zoeller, TR Brown, LL Doan, AC Gore, NE Skakkebaek, AM Soto, TJ Woodruff, FS Vom Saal (2012) Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of principles from The Endocrine Society. *Endocrinology* 153 (9):4097-4110.
- [82] C Sonnenschein, AM Soto (1998) An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *J Steroid Biochem Mol Biol* 65 (1-6):143-150.
- [83] L Guillette, T Gross, G Masson, J Matter, H Percival, A Woodward (1994) Developmental adnormalities of the gonad and adnormal sex-hormone concentrations in juvenile alligator from contaminated and control lakes in Florida. *Environ Health Prspect* 109 (9):608-612.
- [84] C Stoker, MR Repetti, SR Garcia, MA Zayas, GH Galoppo, HR Beldomenico, EH Luque, M Munoz-de-Toro (2011) Organochlorine compound residues in the eggs of broad-snouted caimans (*Caiman latirostris*) and correlation with measures of reproductive performance. *Chemosphere* 84 (3):311-317.
- [85] C Stoker, MA Zayas, MA Ferreira, M Durando, GH Galoppo, HA Rodriguez, MR Repetti, HR Beldomenico, EG Caldini, EH Luque, M Munoz-de-Toro (2013) The eggshell features and clutch viability of the broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) are associated with the egg burden of organochlorine compounds. *Ecotoxicol Environ Saf* 98:191-195.
- [86] F Meijide, G Rey Vázquez, Y Piazza, P Babay, R Itria, F LoNostro (2016) Effects of water borne exposure to 17 $\beta$ -estradiol and 4-tert-octylphenol on early life stages of the South American cichlid fish *Cichlasoma dimerus*. *Ecotox and Environ Safety* 124:82-90.

- [87] F Grun, B Blumberg (2006) Environmental obesogens: organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling. *Endocrinology* 147 (6 Suppl):S50-55.
- [88] AC Gore, VA Chappell, SE Fenton, JA Flaws, A Nadal, GS Prins, J Toppari, RT Zoeller (2015) EDC-2: The Endocrine Society's second scientific statement on endocrine-disrupting chemicals. *Endocr Rev* 36:1-150.
- [89] S Davies, H Behbahaninia, M Giraudeau, SL Meddle, K Waites, P Deviche (2015) Advanced seasonal reproductive development in a male urban bird is reflected in earlier plasma luteinizing hormone rise but not energetic status. *Gen Comp Endocrinol* 224:1-10.
- [90] A Mouritsen, L Aksglaede, K Sorensen, SS Mogensen, H Leffers, KM Main, H Frederiksen, AM Andersson, NE Skakkebaek, A Juul (2010) Hypothesis: exposure to endocrine-disrupting chemicals may interfere with timing of puberty. *Int J Androl* 33 (2):346-359.
- [91] M Durando, G Canesini, LL Cocito, GH Galoppo, MA Zayas, EH Luque, M Munoz-de-Toro (2016) Histomorphological changes in testes of broad-snouted caimans (*Caiman latirostris*) associated with in ovo exposure to endocrine-disrupting chemicals. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol* 325 (1):84-96.
- [92] GH Galoppo, C Stoker, G Canesini, G Schierano-Marotti, M Durando, EH Luque, M Munoz-de-Toro (2016) Postnatal development and histofunctional differentiation of the oviduct in the broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*). *Gen Comp Endocrinol* 236:42-53.
- [93] T Morner, DL Obendorf, M Artois, MH Woodford (2002) Surveillance and monitoring of wildlife diseases. *Rev Sci Tech* 21 (1):67-76.
- [94] R Stahl (1997) Can mammalian and non-mammalian "sentinel species" data be used to evaluate the human health applications of environmental contaminants? *Hum Ecol Risk Assess* 3:329-335.
- [95] DB Peakall, CH Walker (1994) The role of biomarkers in environmental assessment (3). Vertebrates. *Ecotoxicology* 3 (3):173-179.
- [96] NR Council. (1991) Committee on Animals as Monitors of Environmental Hazards, Board on Environmental Studies, Toxicology, . *Chapter 2: Concepts and definitions on animals as sentinel of environmental health hazards*.:33-35.
- [97] CASAFE (2005) Guía de Productos Fitosanitarios (para la República Argentina). Tomos I.
- [98] IARC (2001) *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. WHO. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/>. Accessed 08-11 2017
- [99] IAfRo Cancer (2001) *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. WHO. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/>. Accessed 08-11 2017
- [100] SENASA () *Listado de referencia de Límite Máximo de Residuos (LMR)*. [www.senasa.gob.ar/sites/default/files/...SENASA/...ANEXOS/file4292-anexo-1.pdf](http://www.senasa.gob.ar/sites/default/files/...SENASA/...ANEXOS/file4292-anexo-1.pdf). Accessed 07-11 2017
- [101] Ciba-Geigy (2001) Aatrex Product Booklet
- [102] WA Battaglin, ET Furlong, MR Burkhardt, CJ Peter (2000) Occurrence of sulfonamide, sulfonamide, imidazolinone, and other herbicides in rivers, reservoirs and ground water in the Midwestern United States, 1998. *Sci Total Environ* 248 (2-3):123-133.
- [103] TB Hayes, A Collins, M Lee, M Mendoza, N Noriega, AA Stuart, A Vonk (2002) Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (8):5476-5480.

- [104] T Hayes, K Haston, M Tsui, A Hoang, C Haeffele, A Vonk (2002) Herbicides: feminization of male frogs in the wild. *Nature* 419 (6910):895-896.
- [105] MB Murphy, M Hecker, KK Coady, AR Tompsett, PD Jones, LH Du Preez, GJ Everson, KR Solomon, JA Carr, EE Smith, RJ Kendall, G Van Der Kraak, JP Giesy (2006) Atrazine concentrations, gonadal gross morphology and histology in ranid frogs collected in Michigan agricultural areas. *Aquat Toxicol* 76 (3-4):230-245.
- [106] AL Reeder, GL Foley, DK Nichols, LG Hansen, B Wikoff, S Faeh, J Eisold, MB Wheeler, R Warner, JE Murphy, VR Beasley (1998) Forms and prevalence of intersexuality and effects of environmental contaminants on sexuality in cricket frogs (*Acris crepitans*). *Environ Health Perspect* 106 (5):261-266.
- [107] KA McCoy, LJ Bortnick, CM Campbell, HJ Hamlin, LJ Guillette, CM St Mary (2008) Agriculture alters gonadal form and function in the toad *Bufo marinus*. *Environ Health Perspect* 116 (11):1526-1532.
- [108] TB Hayes, LL Anderson, VR Beasley, SR de Solla, T Iguchi, H Ingraham, P Kestemont, J Kniewald, Z Kniewald, VS Langlois, EH Luque, KA McCoy, M Munoz-de-Toro, T Oka, CA Oliveira, F Orton, S Ruby, M Suzawa, LE Tavera-Mendoza, VL Trudeau, AB Victor-Costa, E Willingham (2011) Demasculinization and feminization of male gonads by atrazine: consistent effects across vertebrate classes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 127 (1-2):64-73.
- [109] L Spano, CR Tyler, R van Aerle, P Devos, SN Mandiki, F Silvestre, JP Thome, P Kestemont (2004) Effects of atrazine on sex steroid dynamics, plasma vitellogenin concentration and gonad development in adult goldfish (*Carassius auratus*). *Aquat Toxicol* 66 (4):369-379.
- [110] TB Hayes, V Khoury, A Narayan, M Nazir, A Park, T Brown, L Adame, E Chan, D Buchholz, T Stueve, S Gallipeau (2010) Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (10):4612-4617.
- [111] F Rey, M Gonzalez, MA Zayas, C Stoker, M Durando, EH Luque, M Munoz-de-Toro (2009) Prenatal exposure to pesticides disrupts testicular histoarchitecture and alters testosterone levels in male *Caiman latirostris*. *Gen Comp Endocrinol* 162 (3):286-292.
- [112] AB Victor-Costa, SM Bandeira, AG Oliveira, GA Mahecha, CA Oliveira (2010) Changes in testicular morphology and steroidogenesis in adult rats exposed to Atrazine. *Reprod Toxicol* 29 (3):323-331.
- [113] J Kniewald, M Jakominic, A Tomljenovic, B Simic, P Romac, D Vranesic, Z Kniewald (2000) Disorders of male rat reproductive tract under the influence of atrazine. *J Appl Toxicol* 20 (1):61-68.
- [114] AM Cummings, BE Rhodes, RL Cooper (2000) Effect of atrazine on implantation and early pregnancy in 4 strains of rats. *Toxicol Sci* 58 (1):135-143.
- [115] RL Cooper, TE Stoker, L Tyrey, JM Goldman, WK McElroy (2000) Atrazine disrupts the hypothalamic control of pituitary-ovarian function. *Toxicol Sci* 53 (2):297-307.
- [116] MG Narotsky, DS Best, DL Guidici, RL Cooper (2001) Strain comparisons of atrazine-induced pregnancy loss in the rat. *Reprod Toxicol* 15 (1):61-69.
- [117] JL Rayner, RR Enoch, SE Fenton (2005) Adverse effects of prenatal exposure to atrazine during a critical period of mammary gland growth. *Toxicol Sci* 87 (1):255-266.
- [118] JC Eldridge, MK Tennant, LT Wetzel, CB Breckenridge, JT Stevens (1994) Factors affecting mammary tumor incidence in chlorotriazine-treated female rats:

- hormonal properties, dosage, and animal strain. *Environ Health Perspect* 102 Suppl 11:29-36.
- [119] MK Kettles, SR Browning, TS Prince, SW Horstman (1997) Triazine herbicide exposure and breast cancer incidence: an ecologic study of Kentucky counties. *Environ Health Perspect* 105 (11):1222-1227.
- [120] MS Christin, AD Gendron, P Brousseau, L Menard, DJ Marcogliese, D Cyr, S Ruby, M Fournier (2003) Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Rana pipiens* and on its resistance to parasitic infection. *Environ Toxicol Chem* 22 (5):1127-1133.
- [121] K Mizota, H Ueda (2006) Endocrine disrupting chemical atrazine causes degranulation through Gq/11 protein-coupled neurosteroid receptor in mast cells. *Toxicol Sci* 90 (2):362-368.
- [122] G Giusi, RM Facciolo, M Canonaco, E Alleva, V Belloni, F Dessi'-Fulgheri, D Santucci (2006) The endocrine disruptor atrazine accounts for a dimorphic somatostatinergic neuronal expression pattern in mice. *Toxicol Sci* 89 (1):257-264.
- [123] CJ Martyniuk, BC Sanchez, NJ Szabo, ND Denslow, MS Sepulveda (2009) Aquatic contaminants alter genes involved in neurotransmitter synthesis and gonadotropin release in largemouth bass. *Aquat Toxicol* 95 (1):1-9.
- [124] JL Griggs, LK Belden (2008) Effects of atrazine and metolachlor on the survivorship and infectivity of *Echinostoma trivolvis* trematode cercariae. *Arch Environ Contam Toxicol* 54 (2):195-202.
- [125] JR Rohr, TR Raffel, SK Sessions, PJ Hudson (2008) Understanding the net effects of pesticides on amphibian trematode infections. *Ecol Appl* 18 (7):1743-1753.
- [126] J Russo, L Lagadic (2000) Effects of parasitism and pesticide exposure on characteristics and functions of hemocyte populations in the freshwater snail *Lymnaea palustris* (Gastropoda, Pulmonata). *Cell Biol Toxicol* 16 (1):15-30.
- [127] PM Beldomenico, F Rey, WS Prado, JC Villarreal, M Munoz-de-Toro, EH Luque (2007) In ovum exposure to pesticides increases the egg weight loss and decreases hatchlings weight of *Caiman latirostris* (Crocodylia: Alligatoridae). *Ecotoxicol Environ Saf* 68 (2):246-251.
- [128] J Iungman, CI Pina, P Siroski (2008) Embryological development of *Caiman latirostris* (Crocodylia: Alligatoridae). *Genesis* 46 (8):401-417.
- [129] M Ferguson (1985), The reproductive biology and embryology of crocodilians., En: *Biology of the reptilia*, (Ed: BF Gans C, Maderson PFA), Wiley, New York, p. 329-491.
- [131] American-Society-of-Ichthyologists-and-Herpetologists (2004) Guidelines for use of live amphibians and reptiles in field and laboratory research. *Revised by the Herpetological Animal Care and Use Committee*.
- [132] M Palkovits (1973) Isolated removal of hypothalamic or other brain nuclei of the rat. *Brain Res* 59:449-450.
- [133] MM Munoz de Toro, MV Maffini, L Kass, EH Luque (1998) Proliferative activity and steroid hormone receptor status in male breast carcinoma. *J Steroid Biochem Mol Biol* 67 (4):333-339.
- [134] RF Bachvarova, BI Crother, K Manova, J Chatfield, CM Shoemaker, DP Crews, AD Johnson (2009) Expression of Dazl and Vasa in turtle embryos and ovaries: evidence for inductive specification of germ cells. *Evol Dev* 11 (5):525-534.
- [135] J Varayoud, L Monje, GS Moreno-Piovan, GH Galoppo, EH Luque, M Munoz-de-Toro, JG Ramos (2012) Sexually dimorphic expression of receptor-alpha in the

- cerebral cortex of neonatal *Caiman latirostris* (Crocodylia: Alligatoridae). *Gen Comp Endocrinol* 179 (2):205-213.
- [136] K Kyrylkova, S Kyryachenko, C Kioussi, M Leid (2012) Determination of gene expression patterns by in situ hybridization in sections. *Methods Mol Biol* 887:23-31.
- [137] S Cikos, A Bukovska, J Koppel (2007) Relative quantification of mRNA: comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. *BMC Mol Biol* 8:113.
- [138] PS Western, JL Harry, JA Graves, AH Sinclair (1999) Temperature-dependent sex determination in the American alligator: AMH precedes SOX9 expression. *Dev Dyn* 216 (4-5):411-419.
- [139] J Kent, SC Wheatley, JE Andrews, AH Sinclair, P Koopman (1996) A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development* 122 (9):2813-2822.
- [140] A Fleming, D Crews (2001) Estradiol and incubation temperature modulate regulation of steroidogenic factor 1 in the developing gonad of the red-eared slider turtle. *Endocrinology* 142 (4):1403-1411.
- [141] S Kohno, MC Bernhard, Y Katsu, J Zhu, TA Bryan, BM Doheny, T Iguchi, LJ Guillette, Jr. (2015) Estrogen receptor 1 (ESR1; ERalpha), not ESR2 (ERbeta), modulates estrogen-induced sex reversal in the American alligator, a species with temperature-dependent sex determination. *Endocrinology* 156 (5):1887-1899.
- [142] Y Katsu, K Kubokawa, H Urushitani, T Iguchi (2010) Estrogen-dependent transactivation of amphioxus steroid hormone receptor via both estrogen and androgen response elements. *Endocrinology* 151 (2):639-648.
- [143] J Hora, B Gosse, K Rasmussen, TC Spelsberg (1986) Estrogen regulation of the biological activity of the avian oviduct progesterone receptor and its ability to induce avidin. *Endocrinology* 119 (3):1118-1125.
- [144] P Boyd-Leinen, B Gosse, K Rasmussen, G Martin-Dani, TC Spelsberg (1984) Regulation of nuclear binding of the avian oviduct progesterone receptor. Changes during estrogen-induced oviduct development, withdrawal, and secondary stimulation. *J Biol Chem* 259 (4):2411-2421.
- [145] JR Schultz, LN Petz, AM Nardulli (2003) Estrogen receptor alpha and Sp1 regulate progesterone receptor gene expression. *Mol Cell Endocrinol* 201 (1-2):165-175.
- [146] ER Simpson, MS Mahendroo, GD Means, MW Kilgore, MM Hinshelwood, S Graham-Lorence, B Amarneh, Y Ito, CR Fisher, MD Michael, et al. (1994) Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev* 15 (3):342-355.
- [147] G Desvages, M Girondot, C Pieau (1993) Sensitive stages for the effects of temperature on gonadal aromatase activity in embryos of the marine turtle *Dermochelys coriacea*. *Gen Comp Endocrinol* 92 (1):54-61.
- [148] P Jeyasuria, AR Place (1998) Embryonic brain-gonadal axis in temperature-dependent sex determination of reptiles: a role for P450 aromatase (CYP19). *J Exp Zool* 281 (5):428-449.
- [149] D Zhu, S Shi, H Wang, K Liao (2009) Growth arrest induces primary-cilium formation and sensitizes IGF-1-receptor signaling during differentiation induction of 3T3-L1 preadipocytes. *J Cell Sci* 122 (Pt 15):2760-2768.
- [150] V Diaz-Hernandez, A Marmolejo-Valencia, H Merchant-Larios (2015) Exogenous estradiol alters gonadal growth and timing of temperature sex determination in gonads of sea turtle. *Dev Biol* 408 (1):79-89.

- [151] R Shao, E Egecioglu, B Weijdegard, JJ Kopchick, J Fernandez-Rodriguez, N Andersson, H Billig (2007) Dynamic regulation of estrogen receptor-alpha isoform expression in the mouse fallopian tube: mechanistic insight into estrogen-dependent production and secretion of insulin-like growth factors. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293 (5):E1430-1442.
- [152] J Varayoud, L Monje, T Bernhardt, M Munoz-de-Toro, EH Luque, JG Ramos (2008) Endosulfan modulates estrogen-dependent genes like a non-uterotrophic dose of 17beta-estradiol. *Reprod Toxicol* 26 (2):138-145.
- [153] H Zhang, LZ Lu, L Chen, ZR Tao, F Chen, SL Zhong, YL Liu, Y Tian, PS Yan (2014) Molecular cloning, expression, and regulation of the ovalbumin gene in pigeon oviduct epithelial cells. *Genet Mol Res* 13 (1):117-126.
- [154] JI Fernandino, RS Hattori, T Shinoda, H Kimura, PH Strobl-Mazzulla, CA Strussmann, GM Somoza (2008) Dimorphic expression of dmrt1 and cyp19a1 (ovarian aromatase) during early gonadal development in pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. *Sex Dev* 2 (6):316-324.
- [155] T Isomura, S Haraguchi, K Miyamoto, K Tsutsui, Y Nakamura, M Nakamura (2011) Estrogen biosynthesis in the gonad of the frog *Rana rugosa*. *Gen Comp Endocrinol* 170 (1):207-212.
- [156] T Iguchi, N Takasugi, HA Bern, KT Mills (1986) Frequent occurrence of polyovular follicles in ovaries of mice exposed neonatally to diethylstilbestrol. *Teratology* 34 (1):29-35.
- [157] PM Vonier, DA Crain, JA McLachlan, LJ Guillette, Jr., SF Arnold (1996) Interaction of environmental chemicals with the estrogen and progesterone receptors from the oviduct of the American alligator. *Environ Health Perspect* 104 (12):1318-1322.